

疾患モデル動物の作出に関する

生殖工学的研究

渡山 肇介

疾患モデル動物の作出に関する

生殖工学的研究

横山 峯 介

## 目 次

緒 言	1
第 I 章 マウスにおける排卵誘起と受精卵および 胚の採取に関する基礎的検討	8
第 1 節 各種系統マウスにおけるの自然排卵数と 誘起排卵数	9
第 2 節 過排卵処理した各種系統マウス雌マウスの 交尾成績と正常胚の採取数	18
第 3 節 5 系統の近交系マウスにおける系統内および 系統間の体外受精	27
第 4 節 小 括	36
第 II 章 体外受精および胚移植による疾患モデルマウスの 産仔の作出	45
第 1 節 トランスジェニックマウスの体外受精・ 胚移植による産仔の作出	46
第 2 節 ミュータントマウスの体外受精・ 胚移植による産仔の作出	57

第3節	体外受精・胚移植によるトランスジェニック マウスの遺伝的背景の変換 .....	68
第4節	小 括 .....	80
第Ⅲ章	凍結保存した精子および胚からの産仔の作出 .....	108
第1節	凍結保存精子の体外受精による産仔の作出 .....	109
第2節	トランスジェニックマウスおよび ミュータントマウスの胚の凍結保存 .....	121
第3節	小 括 .....	129
総合論議	.....	164
総 括	.....	170
謝 辞	.....	176
引用文献	.....	177

## 緒 言

ヒトを含めた各種動物の疾患における病態の解明、診断、治療および予防などに関わる一連の研究を行うためには、モデルとなる動物が重要な役割を担っており、いかに目的に適合したモデル動物を使用できるかが、結果を決めると言っても過言ではない。このような疾患モデル動物は、正常な動物に種々の処置を施して疾患を発症させる実験的発症モデル (artificial animal model) と、個々の動物が持つ遺伝的な要因によって異常を起こす自然発症モデル (spontaneous animal model) とに大別される (川俣, 1976; 近藤, 1984)。前者の実験的発症モデルは長い歴史があり、感染症や発がん、栄養障害などの研究に広く利用されて、大きな貢献をはたしてきた (川俣, 1976; 田嶋, 1978)。この実験的発症モ

デルに比較すると、後者の自然発症モデルの歴史は浅く、ヒトの遺伝性疾患との関連で注目され始めてからのことである。すなわち、1960年代初期から米国において、ヒトにみられるさまざまな遺伝的疾患と類似のものが、他の動物種にもみられることが報告されて、当該の疾患モデルを各種の動物から探索する重要性が示された（Cornelius and Arias, 1966; Orkin, 1967; Leader and Leader, 1971）。これが契機となって、本格的に遺伝的な自然発症の疾患モデル動物の開発・改良および利用の研究が開始された（National Academy of Sciences, 1968, 1969, 1970, 1971）。わが国でも1970年代に入ってから、米国の考えを踏襲するかたちで同様の研究が開始され、その研究成果のいくつかが単行本として出版されている（田嶋, 1978; 川俣・松下, 1979, 1982; 松下, 1982; 京極, 1984）。この疾患モデル開発に関する研究は、現在の実験動物学領域に

おけるもっとも重要な課題の一つとなっている。

疾患モデル動物の開発は、これまでは主に、偶然の機会に見出された自然の突然変異個体から育成したり、特定の形質を有する個体を交配してその仔の選抜を繰り返しながら目的とする系統を育成するなどの方法で、多数のものが育成されてきた（近藤，1984；田嶋，1978；富田ら，1983）。さらに近年は、化学変異原物質の処理によって突然変異を誘発した個体から育成したり（Russell et al., 1979; Chapman et al., 1989）、胚に対する種々の操作を応用して、目的に合ったモデル動物の作製が行えるようになった（Gordon et al., 1980；Mansour et al., 1988）。とくにマウスでは、トランスジェニックやキメラの技術を用いて、疾患を引き起こす元である遺伝子サイドに立つ、病因が明らかな新しい疾患モデル動物の作製が可能となった（Nomura et al., 1987；Jaenisch, 1988；

Capecchi, 1989; 勝木, 1987; Isola and Gordon, 1991)。

これらの実験を行う上では、まず材料となる胚が不可欠である。また、種々の操作を受けた胚から効率的に個体を得る条件を明らかにしておく必要がある。しかし、これらの基礎的な諸条件の検討はいまだ十分には行われていないために、系統により実験の実施が困難である場合が多く、作製効率の低さが深刻な問題の一つとなっている。

また、開発されたモデル動物は、その特性ゆえに繁殖能力が低かったり、不妊であって、系統維持や産仔の生産が困難なものもある(川俣・松下, 1979, 1982; 富田ら, 1983; 京極, 1984)。このような系統のうち、常染色体劣性遺伝のホモ型で発症して不妊となるミュータント系では、ヘテロ型の雌と雄の交配でホモ型個体を得るのが通常とられている方法である(川俣・松下, 1979; 富田ら, 1983; 京極, 1984)。この場合、交配する雌と雄



は、あらかじめ後代検定を行ってミュータント遺伝子をヘテロ型で持つ個体を選抜する必要がある。また、得られる産仔は、ホモ型・ヘテロ型・正常型の各個体が同腹仔として混じって生まれてくるために、胎生期や疾患発症前の時期に、明確にホモ型と判別された個体を用いる実験は不可能である。一方、遺伝形質は、単独遺伝子の作用によってのみ発現するものではなく、動物個々の持っている複数の遺伝子、すなわち遺伝的背景を基盤としているために、その遺伝的背景の差によっても種々の異なる発現形質を生じるものと考えられる(近藤, 1983)。したがって、開発された疾患モデル系統についても、いくつかの近交系に戻し交配を行い、遺伝的背景を変えて実験を行う必要がある。しかし、戻し交配によって、目的の系統に遺伝的背景を変換するには3年間近くの期間がかかることから、その期間を何らかの方法により短縮化することは、実験動物学的な観点からも重要な課題

である。

さらに、つぎつぎと開発される疾患モデルマウスの系統を個体で維持することは、その数の増加によって困難となり、継代維持の過程での突然変異や遺伝的コンタミネーション等による遺伝的変異を回避することも不可能である。このことから、初期胚あるいは配偶子の凍結保存によって、系統を安全かつ省力化したかたちで保存することは、疾患モデル動物の開発・改良の研究を進める上で、欠くことのできないものと考えられる（横山，1982；横山ら，1987；横山ら，1989）。

マウス初期胚の凍結保存の確実な成功例は、1972年にWhittingham et al., (1972)とWilmut(1972)によって独立に報告されて以来、保存液の組成や凍結、融解法などがいろいろと検討されてきた(Mühlbock, 1976; Leibo and Mazur, 1978 ; Zeilmaker, 1981; Yokoyama, et al., 1981)。しかしながら、凍結に供する胚を各種系統から採取すること

だけでなく、凍結・融解した胚の移植による産仔への発生や得られた個体に対する凍結保存操作の影響等の検討は十分ではない。

本研究では、これらの問題点を解決するために、過排卵の誘起、卵子の体外受精、胚および配偶子の凍結保存等の生殖工学を基盤とする新しい実験システムを駆使して、疾患モデル動物の作出を試みた。すなわち、第1章では、まず一般的な系統について、性腺刺激ホルモン処理による排卵の誘起と、体外受精による胚の作製に関する基礎的条件を調べた。また第2章では、この成果を基にして、繁殖障害を伴う系統を含めた各種トランスジェニックおよびミュータントマウスを用いて、体外受精および胚移植による産仔の作出とその系統化を試みた。さらに第3章では、これらの動物の遺伝子保存のための精子および胚の凍結保存を検討し、その実用化を図った。

## 第 1 章

### マウスにおける排卵誘起と受精卵および

#### 胚の採取に関する基礎的検討

## 第1節 各種系統マウスにおける

### 自然排卵数と誘起排卵数

#### はじめに

マウスの雌では、性腺刺激ホルモンの投与によって性周期に関わりなく排卵を誘起できることから、未受精卵や雄と交配させた後に初期胚を得る方法として広く利用されている (Gates, 1971; Biggers et al., 1971; 佐久間・石島, 1975; 豊田, 1990)。とくに近年は、進展の著しい発生工学や生殖工学などの初期胚を用いる研究を実施する上で、欠くことのできない基本技術の一つとなっている (勝木・横山, 1985; Hogan et al., 1986; 勝木ら, 1987; 豊田, 1988; Wassarman and DePamphilis, 1993)。しかしながら、マウスでは投与するホルモン量や間隔、使用する動

物の日齢および性周期、さらに系統の違いによってもその誘起排卵効果には大きな差のあることも知られている (Zarrow and Wilson, 1961; Wilson and Zarrow, 1962; 伊藤ら, 1974; 石島ら, 1978; Hogan et al., 1986)。本実験では、各種系統マウスの繁殖生理学的な特性を明らかにし、その有効利用を図るための研究の一環として、いくつかの近交系、交雑系およびクローズドコロニーの自然排卵数と性腺刺激ホルモンの投与による誘起排卵数を調べた。

## 材料および方法

### 1. 使用動物

(財) 実験動物中央研究所 (以下は実中研と略す) において生産された AKR, BALB/c, CBA, C3H/He, C57BL/6, DBA/2, KK, NFS, NOD の 9 系統の近交系と、日本クレアから購

入した四元交雑系のMCH(ICR)およびクローズドコロニーのICR, NIH(S)の合計12系統のマウスを使用した。雌は未経産個体を対象として10-16週齢で、また交配用の雄は12-24週齢で実験に供した。

## 2. 飼育条件

動物室は6:00点灯・20:00消灯の14時間明・10時間暗とし、温度 $24 \pm 2$  °C、湿度50-60%、換気回数10-15/時間に調節した。動物の飼育は、プラスチック製ケージで行い、床敷として木製チップを用いた。これらはオートクレイブ滅菌(121 °C・20分)して使用した。飼料は固形飼料(CA-1; 日本クレア)を、また飲料水は水道水を、ともに自由摂取させた。

## 3. 自然排卵数の検査

自然排卵数は、発情前期の雌を雄と交配して、交尾の確認された個体から得られた排卵数によって算出した。すなわち、雌マウスは

夕方の16:00-18:00に、外陰部が腫張して赤色を帯びることを指標として発情前期のものを選び出し(Champlin, 1973)、同系統の雄のケージに入れて1対1で一晩同居させて交配した。交尾の確認は、翌朝9:00-10:00に雌の膣栓形成の有無で行い、交尾陽性の個体のみを実験に供した。まず、頸椎脱臼で殺処分した雌から卵巣・卵管・子宮をまとめて摘出し、濾紙上で卵管を注意深く分離した後、2枚のスライドグラス間に挟んで軽く押し、実体顕微鏡下(×40)で卵管膨大部に留まっている卵子を数えた。

#### 4. 誘起排卵数の検査

雌マウスに1.25, 2.5, 5.0および10.0 i. u. の妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG, セロトロピン; 帝国臓器)を夕方の16:30に腹腔内注射し、さらにその48時間後に5.0 i. u. のヒト絨毛性腺刺激ホルモン(hCG, ゴナトロピン; 帝国臓器)を同様に腹腔内注射して排卵



を誘起した。なお、これらの性腺刺激ホルモンは、雌の性周期を考慮しないで処理した。排卵数の検査は、hCG 注射後18-20 時間に雌を殺処分し、前述の自然排卵数の場合と同様にして行った。なお、卵子は、卵丘細胞に含まれているものを新しい卵子、含まれていないものを古い卵子として2群に分類し、新しい卵子のみを誘起排卵された卵子とした。

## 成 績

近交系9系統、交雑系1系統およびクローズドコロニー2系統の自然排卵数を表1-1に示した。近交系の排卵数は9.1-12.8個の範囲で、AKR がもっとも多く、DBA/2 とBALB/cが中間、CBA, C3H/He, C57BL/6, KK, NFS ならびに NODが少ない系統として大別された。クローズドコロニーの ICRは13.7個と近交系よりも多い排卵数であったが、NIH(S)は近交系

と差のない10.8個であった。また、クローズドコロニーの動物から育成された、4系統の近交系1CRの交雑系(四元交雑)であるMCH(1CR)は、15.4個と今回調べた系統でもっとも多い排卵数であった。

PMSGとhCGを投与した雌の排卵陽性成績とその誘起排卵数を表1-2および表1-3に示した。BALB/c, CBAならびにNODの一部で、排卵陰性の個体がみられたが、その他は全例とも排卵が確認された。誘起排卵数は、PMSG 1.25 i. u. 群で自然排卵数に近い値が得られたが、BALB/cおよびMCH(1CR)では約2倍の値であった。PMSG投与量の増加に伴って排卵数も多くなり、BALB/cおよびNIH(S)を除いては、5.0 i. u. 群でもっとも多い値であった。しかし、さらにPMSG投与量の多い10.0 i. u. 群では、5.0 i. u. 群と同じか逆に減少する傾向が認められた。各系統の自然排卵数と誘起排卵数の関係を図1に示した。自然排卵数に対する誘起排卵数の増加率は、1.7-4.8倍の範囲

であった。排卵数の増加率の高い系統として NOD, DBA/2 および NIH(S) が、また、低い系統として AKR および BALB/c が認められた。

### 考 察

観察を行った各系統の自然排卵数は、同一系統内ではバラツキは認められなかった。これは使用した個体が未経産の成熟した 10-16 週齢のもので、体重等の条件が揃っていたことによると考えられる。猪ら (1969) は、マウスの排卵数と産仔数の関係を詳細に検討し、系統によっては排卵数と産仔数は必ずしも平行関係にないことを報告している。本実験で得られた近交系 9 系統の排卵数は、実中研の動物生産の場における各系統の初回産仔数 (未発表) と比較しても必ずしも平行関係にはなかった。排卵数と産仔数との間に差の少ない系統としては C57BL/6 と NFS を、逆に差

の大きい系統としてはAKR, BALB/c, CBAおよびDBA/2 をあげることができた。

一方、誘起排卵では、12系統中の10系統でPMSGとhCG 投与量が各5.0 i. u. 群でもっとも多い排卵数が得られた。PMSGとhCG 投与によるマウスの排卵数は、PMSGの用量に関係して、過剰な投与量は排卵数および排卵陽性率の低下を招くことが知られており(豊田, 1979)、本実験でも同様の結果が得られた。

自然排卵数に対する排卵増加率は、系統間で大きな差が認められた。すなわち、NOD ならびにNFS では増加率が高く、4.5 倍以上で平均45個を上まわる排卵数であった。逆に低いものは、AKR, BALB/cで約 2倍の増加率であった。

マウスでは、性腺刺激ホルモンに対する反応性に系統差があり、反応性が高くて排卵数の多い近交系としてはC57BL/6J, BALB/cByJ, 129/SvJ, BA/CaJ, SJL/J, C58/J が、逆に、反応性が低くて排卵数の少ないものはA/J,

C3H/HeJ, BALB/cJ, 129/J, 129/ReJ, DBA/2J, C57/L などが知られている (Hogan et al., 1986)。本実験の結果では、反応性がもっとも低い系統 (AKR, BALB/c) でも自然排卵数の約 2 倍、高い系統 (NOD, DBA/2, NIH(S)) では約 4.5 倍の誘起排卵数が得られた。

以上のように、PMSG と hCG 処理による誘起排卵数には、系統により差がみられるものの、効率的に過排卵を誘起できることが示された (横山・長谷川, 1989)。

## 第2節 過排卵処理した各種系統雌マウスの交尾成績と正常胚の採取数

### はじめに

第1節では、各種系統の雌マウスにPMSGとhCGの処置を施すことによって、効率的に過排卵を誘起できることが示された。実験材料としての受精卵および初期胚を得るためには、この雌をさらに雄と交配させなければならない。しかし、マウスは系統によって、排卵数や交尾成績に大きな差があることが知られており (Yokoyama et al., 1981; Mobraaten, 1981; Brinster et al., 1985)、実験を開始するにあたっては、それぞれの系統について前もって調査しておく必要性が指摘されている (Hogan et al., 1986; 勝木ら, 1987)。本実験では、第1節に引き続き、各種系統マウ

スの繁殖生理学的な特性を明らかにして、その有効利用を図るために、広く使用されている近交系を用いて、PMSCとhCG投与による過排卵処理後の交尾成績を調べるとともに、交尾成立雌から胚採取を行い、その正常性を調べた。

#### 材料および方法

##### 1. 使用動物

実中研において生産された A/He, AKR, BALB/c, CBA, C3H/He, C57BL/6, C57BL/10Sc CL/Fr, DBA/1, DBA/2, DDD, IDT, KK, LT/Sv MRL/Mp, NC, NFS, NOD, NZB, NZW, P, SJJ, SWV および129/Svの24系統の近交系マウスを使用した。なお、雌は未経産個体を対象として8-16週齢で、交配用の雄は12-24週齢で実験に供した。

## 2. 飼育条件

動物の飼育は、第1節に述べた条件で行った。

## 3. 過排卵の誘起と交配

過排卵誘起の方法は、第1節の成績をもとに決めた。すなわち、各系統の雌に5.0 i. u. のPMMSGを腹腔内注射し、その48時間後に5.0 i. u. のhCGを同様に注射して過排卵を誘起した。各性腺刺激ホルモンは、夕方の17:00-18:00に投与した。なお、雌の性周期は考慮せずに処理を行った。雌はhCG注射後直ちに同系統の雄のケージ内に移し、一晚同居させて交配した。交配は1匹飼いの雄のケージ内に雌を1匹入れる方式で行った。なお、交尾の確認は、翌朝の9:00-10:00に雌の膣栓形成の有無を観察することによって行った。

## 4. 胚の採取と検査

交尾を確認した雌は、雄と分離して飼育を



続け、腫栓の確認した日から2日後の11:00-14:00 (hCG注射後67~70時間) に殺処分して胚を採取した。すなわち、頸椎脱臼法で殺処分した雌から子宮・卵管・卵巣をまとめて摘出し、濾紙上で卵管および子宮を分離した。つぎに卵管をプラスチックシャーレ(10×35mm)内の流動パラフィンで被われた培地中に移し、実体顕微鏡下(×25-40)で30ゲージ注射針を装着した注射筒を用いて卵管采から子宮方向に少量の培地で静かに内容物を灌流して胚を採取した。また、子宮についても同様に灌流を行って胚を採取した。採取胚は、各個体ごとにその数をかぞえ、さらに倒立顕微鏡下(×100-200)で形態的な検査を行った。なお、8細胞期にあるものを正常胚とし、また、2-7細胞期胚を発生遅延胚、さらに異常分割ならびに変性退行過程のものを異常胚として分類した。

## 成 績

PMSGとhCG を処理した各種系統マウスの交配成績を表 1-4に示した。交尾成績（雌の膣陰陽性率）は、系統により大きな差が認められた。DBA/1, C3H/He, BALB/c では 70% 以上(71.6-78.6%)の高い値であるのに対して、LT/Sv, AKR, SJL では 30%以下(15.8-26.1%)の低い値であった。使用した系統あたりで見ると、50% 以上の交尾陽性率を示したものが13系統 (54.2%)であり、50% 以下のものが11系統(45.8%)であった。

交尾が確認された雌個体からの胚の採取成績を表 1-5に示した。採取胚数の多かった系統は、MRL/Mp(平均胚数:55.1), 1DT(48.7), NOD(47.7), P(47.3)で、自然排卵数に対する4-5 倍の値であった。逆に少ない系統は、SJL(9.0), NZW(9.6), A/He(11.5), NZB(11.8)で、自然排卵数とほぼ同数の値であった。正常卵の採取数も系統により大きな差がみら

れた。採取胚数の多い系統は、SWV(平均胚数:31.3), NOD(27.6), P(26.8), IDT(26.6)で、自然排卵数の2倍以上の値であった。これらの系統はともに、採取胚の総数に対する正常胚の割合が高い傾向にあった。逆に正常胚の割合が低い系統は、NZB(3.5), AKR(4.3), NBW(4.4), SJL(5.1), MRL/Mp(5.6)で、自然排卵数や生産の場における初回産仔数(未発表)よりも少ない値であった。また、AKR, CBA, MRL/Mpでは、発生遅延胚(2-7細胞期胚)が、正常胚(8細胞期胚)よりも高い値で採取された。

交尾が不成立におわった個体をも含めた使用雌総数に対する正常胚の採取効率は、IDT(平均胚数:15.5), SWV(12.3), C3H/He(12.1), NOD(10.7)で高く、逆にAKR(0.8), SJL(1.3), NZB(1.9), NZW(2.3), 129/Sv(2.6), LT/Sv(2.9)と極めて低かった。

## 考 察

本実験で得られた採取胚数には、系統により大きな差がみられた。また、交尾の確認された各系統の個体からの採取胚には、異常と判定されたものが高い割合で含まれていた。マウスでは、PMSGの単一投与によっても自然排卵数に近い排卵が起きることから(Kaufman and Whittingham, 1972)、本実験でものPMSG投与によって排卵したものが、卵管および子宮に留まっていて、hCG投与により排卵されたものと混じって一緒に採取されたことが窺われた。これらのPMSG投与時に排卵した卵子は、変性退行した異常卵として採取されたと推察されるが、hCG投与により排卵された卵子で異常なものとの判別が不可能なために、とくに区別せずに採取胚総数としてまとめた。なお、AKR, CBA, MRL/Mp等では、発生遅延胚とした2-7細胞期胚が、正常胚とした8細胞期胚よりも高い値で採取された。これらの

発生遅延胚の正常性については、十分な検討は行わなかったが、マウスの胚発生速度には系統差のあることが報告されており(Whitten and Dagg, 1961)、これらの胚も採取の時期を遅らせることにより、正常胚として得られることも考えられる。さらに、本実験では、雌の性周期を考慮することなしにPMSGとhCGの投与を行ったが、ラットの成熟雌に過排卵を誘起させるには、動物の体内のホルモン動態に同調させて、PMSGとhCGを投与する必要があると報告されている(Yamamura et al., 1982)。マウスでもこの方法により、交尾成績と過排卵の効率を向上させることが考えられる。

Mobraaten (1981)、Glenister and Lyon (1981)および著者ら、(1981)は、PMSGとhCGの処理によって過排卵を誘起して交配し、凍結保存に供するマウス8細胞期胚を採取した成績を報告している。それによれば、交尾陽性率と過排卵の誘起効果、正常胚の採取効率

には、系統によって大きな差のあることを認めている。これまで述べたように、本実験で得られた結果も、これを再確認する成績であった。

すなわち、PMSGとhCGの処理によって過排卵は誘起できるが、半数の系統では交尾成立の変動が大きく、採取できる正常胚数の予測は困難であることが知られた(横山・日置, 1990)。今後、正常胚の採取効率の悪い系統については、さらにホルモンの投与量や投与の間隔、動物の日齢、性周期などを考慮して、それぞれの系統に適合する条件を検討する必要があると考える。また、過排卵された未受精卵を用いる体外受精技術の確立も重要な課題といえる。

### 第3節 5系統の近交系マウスにおける 系統内および系統間の体外受精

#### はじめに

発生工学や生殖工学などの実験を行う上では、まず材料となる胚がなければならない。マウスでは、PMSGとhCGを処理して過排卵を誘起した雌を、雄と交配させて胚を得るのが普通行われている方法である。しかし、繁殖能力の高い交雑系やクローズドコロニーなど一部の系統を除いては、実験材料としての胚を必要に応じて効率よく得るのは容易ではないことである（豊田，1988）。第1節および第2節から明らかとなったように、一般的に広く使用されている近交系でもその半数の系統は、過排卵を誘起できるにも関わらず、交尾成績が低く、採取できる正常胚数も多く

はないものであった。本実験では、PMSGとhCGの処理によって得られる未受精卵と、雄の精巣上体精子を用いて、体外受精による受精卵の作製を検討した。

### 材料および方法

#### 1. 使用動物

実中研において生産されたBALB/c, C3H/He C57BL/6, DDDおよびNCの5系統の近交系マウスを使用した。雌は未経産個体を8-16週齢で、雄は12-24週齢で実験に供した。

#### 2. 飼育条件

動物の飼育は、第1節に述べた条件で行った。

#### 3. 培地

筆者らの考案した修正クレブスリングル重



炭酸培地 [TYH 培地] (豊田ら, 1971a) を使用した。使用に際しては、培地の 0.4 ml をプラスチックシャーレ (35 × 15 mm) に分注して上面をパラフィンオイルで被い、一晚炭酸ガス培養装置内 (温度 37°C; 5% 炭酸ガス・95% 空気) に静置し、温度と気相を平衡させた。

#### 4. 体外受精

体外受精は、豊田ら (1971a, 1971b) の方法に準じて行った。すなわち、卵子は、雌マウスに 5.0 i. u. の PMSG と hCG を 48 時間間隔で腹腔内注射して過排卵を誘起し、hCG 注射後 16-17 時間に卵管膨大部より採取した。この卵子を前述の 0.4 ml の TYH 培地に導入した。精子は、雄の精巣上体尾部から採取し、TYH 培地に懸濁して 1-1.5 時間インキュベートした後、媒精に供した。媒精は卵子を含む 0.4 ml の培地に 5-10  $\mu$ l の精子液を加えて行った。受精の場の最終精子濃度は、もとの精子液濃度と加えた精子液量から 100-300/ $\mu$ l と推定され

た。媒精を行ったシャーレは、直ちに炭酸ガス培養装置内に戻し、4-6 時間培養した。

#### 5. 卵子の検査

媒精後 4-6 時間に、卵子を新しい培地に移し替えることによって洗浄し、ホールマウン  
ト標本として位相差顕微鏡下で観察した。ま  
た、一部の標本は、必要に応じてホルマリン  
固定してラクモイド染色を施し、生標本では  
観察不可能な卵子の染色体や侵入精子の頭部  
変化を再び観察した。判定基準としては、精  
子が卵子の透明帯を通過したすべてのものを  
精子侵入卵子とし、卵細胞質内に精子の侵入  
の認められたものを受精卵とした。さらに、  
細胞質内に 2 個以上の精子が認められたもの  
を多精子受精卵として分類した。

#### 6. 統計処理

精子侵入率および受精率は、 $\chi^2$ -検定を行  
った。

## 成 績

5 系統の近交系マウスの系統内および系統間の体外受精成績を表 1-6 に示した。精子侵入率は、系統内では 88.1-100% であり、系統間では 86.0-100% の成績であった。すなわち、系統内では C57BL/6 精子と C57BL/6 卵子との組み合わせで 88.1%、また、系統間では BALB/c 精子と C3H/He 卵子との組み合わせで 86.0% と、それぞれ最も低い値であったが、他の組み合わせとの間には有意な差は認められなかった。

受精率については、系統内では 88.1-100% と、精子侵入率と同様に有意な差はみられなかった。しかし、系統間における BALB/c 精子と C3H/He 卵子との組み合わせで 68.0% と最も低い値が得られた。この値は、BALB/c 精子と他の 4 系統の卵子、ならびに C3H/He 卵子と他の 4 系統の精子との組み合わせで得られた成績 (87.5-99.1%) と比較すると有意に低い

ものであった( $P < 0.05$ )。

各組み合わせにおける多精子受精率を図 1-2 に示した。それぞれの系統の組み合わせによってバラツキがみられ、BALB/c と C57BL/6 の精子を用いた組み合わせでは低く、C3H/He と NC では高い多精子受精率であった。また、C57BL/6 の卵子を用いた組み合わせでは低かったが、BALB/c、DDD ならびに NC の卵子では高い値であった。

#### 考 察

本実験では、系統内および系統間の体外受精において、ごく一部の組み合わせ(BALB/c 精子と C3H/He 卵子)を除いて、安定した高い受精成績が得られた。媒精後 4-6 時間に、卵子の染色体と侵入精子の頭部の変化ならびに雌性・雄性前核の形成の有無を調べたが、大多数のものは前核期の発生段階にあった。し

かし、BALB/c精子とC3H/He卵子との組み合わせで得られた受精卵には、精子が侵入して間もないと推察される、染色体が第2成熟分裂の後期から終期像で、膨大精子頭を持つものが29.4%(30/102)の値で認められた。同様に、BALB/cの系統内でも25.0%(28/112)の値で観察された。これらのことから、BALB/c精子とC3H/He卵子との組み合わせで得られた低い受精率は、精子侵入時期の遅延による可能性が推察された。しかし、BALB/c精子においてもC57BL/6、DDDならびにNCの卵子との組み合わせでは、受精卵の95%以上のものが前核期であり、精子侵入時期の遅れはとくに認められなかった。この違いについては、現段階では不明であるが、媒精後から時間をおって精子侵入時期を観察するなどの検討が必要と考える。

マウスの体外受精においては、系統差のあることが早くから認められている(Iwamatsu, and Chang, 1971; Kasai et al., 1978)。さ

らに、Parkening and Chang (1976)は、マウスの体外受精率には系統差があり、C3H, CD-1 (アウトブレッド) および交雑F1の精子の受精成績は高いが、C57BL/6 精子は有意に低いことを報告している。また、守田ら(1977)は、4系統の近交系と2系統のアウトブレッドを用いて体外受精を行い、受精率と受精卵の初期発生速度に系統差のあることを報告している。これによれば C57BLは他の系統に比べて受精率が低く、初期胚の発生速度も遅い。

さらに、鈴木ら(1991)は、51系統の未成熟雌から卵子を採取し、クローズドコロニーのICR 系雄の精巣上体精子により体外受精を行っている。これによれば、精子が同一系統であっても受精率には大きな系統差がみられたことから、マウス胚を用いる研究における系統差を考慮する必要性を指摘している。しかし、本実験では、C57BL/6 精子の受精率がとくに低いという結果は得られなかった。これについては現時点では明確ではないが、使用

した動物が異なることや実験の実施条件の違いなどが考えられる。

以上のごとく、本実験で用いた5系統の近交系マウスの系統内および系統間の体外受精率は、ごく一部の組み合わせを除けば、非常に高く安定した成績であることが知られた。また、交配による体内受精に比較して受精成績に変動が少なく、発生段階の揃った受精卵や胚を安定したかたちで作製できることが明らかとなった（横山・長谷川，1991）。

#### 第 4 節 小 括

発生工学や生殖工学の実験を行うには、材料としての胚が不可欠である。本章では、性腺刺激ホルモン(PMSG-hCG)処理による誘起排卵の条件を調べ、さらに交配および体外受精による胚採取に関する基礎的条件を調べた。

その結果、マウスの成熟未経産雌にPMSGとhCG処理することにより、性周期の考慮なしに自然排卵数の1.7-4.8倍の値で過排卵を誘起することが示された。しかし、過排卵処理した雌の交尾陽性率は約半数と低く、得られる正常胚の値も必ずしも多くはないことが知られた。さらに、排卵誘起された卵子と雄の精巣上体尾部精子の体外受精では、系統内のみならず系統間の組み合わせでも高い受精率が得られ、交配による体内受精に比較しても変動の少ないことが明らかとなった。



表 1-1 各種系統マウスの自然排卵数

系 統	検査動物数	排卵数 (平均±S. D)
AKR	22	12.8±1.6
BALB/c	25	11.3±1.8
CBA	20	9.2±1.0
C3H/He	20	10.2±0.9
C57BL/6	23	9.1±2.4
DBA/2	21	11.6±1.7
KK	21	10.0±1.6
NFS	24	10.0±1.2
NOD	22	9.7±1.0
Jc1:MCH(ICR)	31	15.4±2.9
Jc1:ICR	20	13.7±1.4
Jc1:NIH(S)	23	10.8±1.5

表 1-2 各種系統マウスの PMSG-hCG 処理による誘起排卵成績

系 統	PMSG 投与量 (i. u)	hCG 投与量 (i. u)	使用雌数	排卵陽性 雌数 (%)	排卵陽性雌 あたりの排卵数 (平均±S. D)
AKR	1.25	5.0	5	5(100)	11.6± 3.9
	2.5	5.0	7	7(100)	13.3± 5.6
	5.0	5.0	6	6(100)	22.2±11.8
	10.0	5.0	6	6(100)	21.8± 5.7
BALB/c	1.25	5.0	10	10(100)	17.7±10.8
	2.5	5.0	9	9(100)	20.8± 7.9
	5.0	5.0	10	10(100)	23.1±13.5
	10.0	5.0	10	9( 90)	30.8±17.7
CBA	1.25	5.0	10	10(100)	11.6± 3.0
	2.5	5.0	11	11(100)	23.1± 6.3
	5.0	5.0	11	11(100)	29.5± 8.5
	10.0	5.0	10	8( 80)	8.0± 9.3
C3H/He	1.25	5.0	5	5(100)	11.0± 1.6
	2.5	5.0	6	6(100)	17.2± 8.6
	5.0	5.0	5	5(100)	29.4± 8.2
	10.0	5.0	5	5(100)	18.6±13.0
C57BL/6	1.25	5.0	5	5(100)	10.6± 1.8
	2.5	5.0	5	5(100)	13.3± 5.6
	5.0	5.0	5	5(100)	22.2±11.8
	10.0	5.0	5	5(100)	21.8± 5.7
DBA/2	1.25	5.0	6	6(100)	12.8± 2.3
	2.5	5.0	5	5(100)	22.6±11.7
	5.0	5.0	5	5(100)	43.6± 6.3
	10.0	5.0	6	6(100)	26.7±16.4
KK	1.25	5.0	9	9(100)	5.8± 1.6
	2.5	5.0	9	9(100)	8.4± 4.0
	5.0	5.0	8	8(100)	29.3±13.2
	10.0	5.0	10	10(100)	16.4± 9.6
NFS	1.25	5.0	6	6(100)	13.7± 3.8
	2.5	5.0	6	6(100)	22.5±14.6
	5.0	5.0	6	6(100)	45.7±22.0
	10.0	5.0	6	6(100)	43.5±13.5
NOD	1.25	5.0	9	7( 78)	9.6± 1.0
	2.5	5.0	9	8( 89)	17.3±10.0
	5.0	5.0	9	9(100)	46.3±16.7
	10.0	5.0	9	8( 89)	24.9± 8.0

表 1-3 各種系統マウスの PMSG-hCG 処理による誘起排卵成績

系 統	PMSG 投与量 (i. u)	hCG 投与量 (i. u)	使用雌数	排卵陽性 雌数 (%)	排卵陽性雌 あたりの排卵数 (平均±S. D)
Jcl:					
MCH(ICR)	1.25	5.0	10	10(100)	30.1±12.1
	2.5	5.0	10	10(100)	21.9± 8.6
	5.0	5.0	10	10(100)	44.1± 8.0
	10.0	5.0	10	10(100)	20.0± 8.2
Jcl:ICR	1.25	5.0	7	7(100)	12.6± 1.1
	2.5	5.0	5	5(100)	14.0± 4.5
	5.0	5.0	5	5(100)	39.7±23.1
	10.0	5.0	5	5(100)	23.6±13.6
Jcl:NIH(S)	1.25	5.0	6	6(100)	9.5± 4.5
	2.5	5.0	6	6(100)	12.8±11.5
	5.0	5.0	6	6(100)	41.2±20.7
	10.0	5.0	6	6(100)	42.3± 7.7

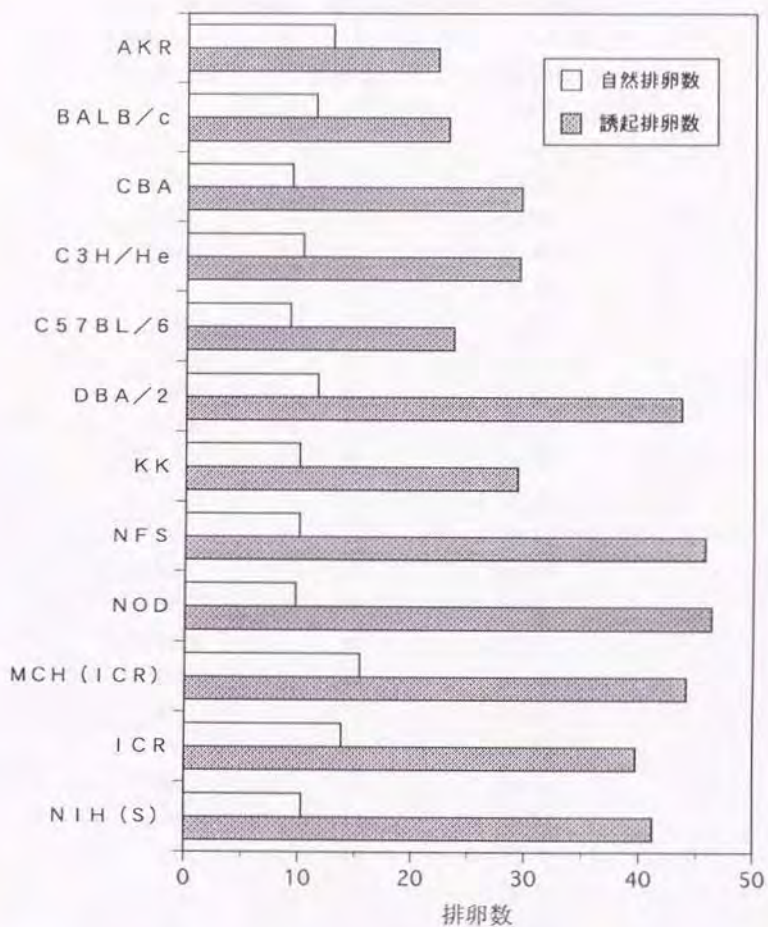


図1-1 各種系統マウスにおける自然排卵数と誘起排卵数との関係

表 1-4 誘起排卵処理した各種近交系マウスの交尾成績

系 統	使用雌数	腔栓陽性雌数 (%)
A/He	8	4 (50.0)
AKR	64	12 (18.8)
BALB/c	141	101 (71.6)
CBA	22	10 (45.5)
C3H/He	72	56 (77.8)
C57BL/6	104	45 (43.3)
C57BL/10Sc	29	16 (55.2)
CL/Fr	15	7 (46.7)
DBA/1	14	11 (78.6)
DBA/2	113	44 (38.9)
DDD	15	6 (40.0)
IDT	12	7 (58.3)
KK	72	41 (56.9)
LT/Sv	19	3 (15.8)
MRL/Mp	26	17 (65.4)
NC	8	5 (62.5)
NFS	26	13 (50.0)
NOD	18	7 (38.9)
NZB	30	16 (53.3)
NZW	44	23 (52.3)
P	11	4 (36.4)
SJL	92	24 (26.1)
SWV	23	9 (39.1)
129/Sv	16	6 (37.5)

表 1-5 誘起排卵処理した各種近交系マウスからの胚採取成績

系 統	腹腔陽性		正常胚数 (%)	腹腔陽性雌	使用雌
	雌数	採取胚数		あたりの 正常胚数	あたりの 正常胚数
A/He	4	46	27 (58.7)	6.8	3.4
AKR	12	256	51 (19.9)	4.3	0.8
BALB/c	101	1544	911 (59.0)	9.0	6.5
CBA	10	214	77 (36.0)	7.7	3.5
C3H/He	56	1096	873 (79.7)	15.6	12.1
C57BL/6	45	921	569 (61.8)	12.6	5.5
C57BL/10Sc	16	367	223 (60.8)	13.9	7.7
CL/Fr	7	159	98 (61.6)	14.0	6.5
DBA/1	11	247	124 (50.2)	11.3	8.9
DBA/2	44	692	382 (55.2)	8.7	3.4
DDD	6	131	54 (41.2)	8.5	3.6
IDT	7	341	186 (54.5)	26.6	15.5
KK	41	858	589 (68.6)	14.4	8.2
LT/Sv	3	91	55 (60.4)	18.3	2.9
MRL/Mp	17	937	95 (10.1)	5.6	3.7
NC	5	103	30 (29.1)	6.0	3.8
NFS	13	203	129 (63.5)	9.9	5.0
NOD	7	334	193 (57.8)	27.6	10.7
NZB	16	188	56 (29.8)	3.5	1.9
NZW	23	220	101 (45.9)	4.4	2.3
P	4	189	107 (56.6)	26.8	9.7
SJL	24	215	123 (57.2)	5.1	1.3
SWV	9	316	282 (89.2)	31.3	12.3
129/Sv	6	139	41 (29.5)	6.8	2.6

表 1-6 5系統の近交系マウスにおける系統内および系統間の体外受精

系 統		検査 卵数	精子侵入 卵数 (%)	受精卵数 (%)	多精子受精 卵数 (%)*
卵子	精子				
BALB/c	BALB/c	116	115( 99.1)	112( 96.6)	5 ( 4.5)
	C3H/He	120	120(100.0)	118( 98.3)	16 (13.6)
	C57BL/6	104	104(100.0)	104(100.0)	6 ( 5.8)
	DDD	126	124( 98.4)	124( 98.4)	21 (16.9)
	NC	128	117( 91.4)	116( 90.6)	20 (17.2)
C3H/He	BALB/c	150	129( 86.0)	102( 68.0)	3 ( 2.9)
	C3H/He	112	111( 99.1)	111( 99.1)	12 (10.8)
	C57BL/6	120	109( 90.8)	105( 87.5)	5 ( 4.8)
	DDD	121	115( 95.0)	115( 95.0)	9 ( 7.8)
	NC	120	118( 98.3)	118( 98.3)	12 (10.2)
C57BL/6	BALB/c	101	98( 97.0)	96( 95.0)	0 ( 0 )
	C3H/He	102	102(100.0)	102(100.0)	5 ( 4.9)
	C57BL/6	126	111( 88.1)	111( 88.1)	1 ( 0.9)
	DDD	97	95( 97.9)	95( 97.9)	7 ( 7.4)
	NC	122	121( 99.2)	121( 99.2)	5 ( 4.1)
DDD	BALB/c	137	133( 97.1)	126( 92.0)	2 ( 1.6)
	C3H/He	118	118(100.0)	118(100.0)	15 (12.7)
	C57BL/6	108	108(100.0)	108(100.0)	11 (10.2)
	DDD	115	108( 93.9)	106( 92.2)	5 ( 4.7)
	NC	108	106( 98.1)	105( 97.2)	23 (21.9)
NC	BALB/c	118	117( 99.2)	111( 94.1)	4 ( 3.6)
	C3H/He	105	105(100.0)	105(100.0)	23 (21.9)
	C57BL/6	113	109( 96.5)	109( 96.5)	7 ( 6.4)
	DDD	118	118(100.0)	117( 99.2)	18 (15.4)
	NC	107	107(100.0)	107(100.0)	21 (19.6)

\* : 受精卵に対する多精子受精の割合

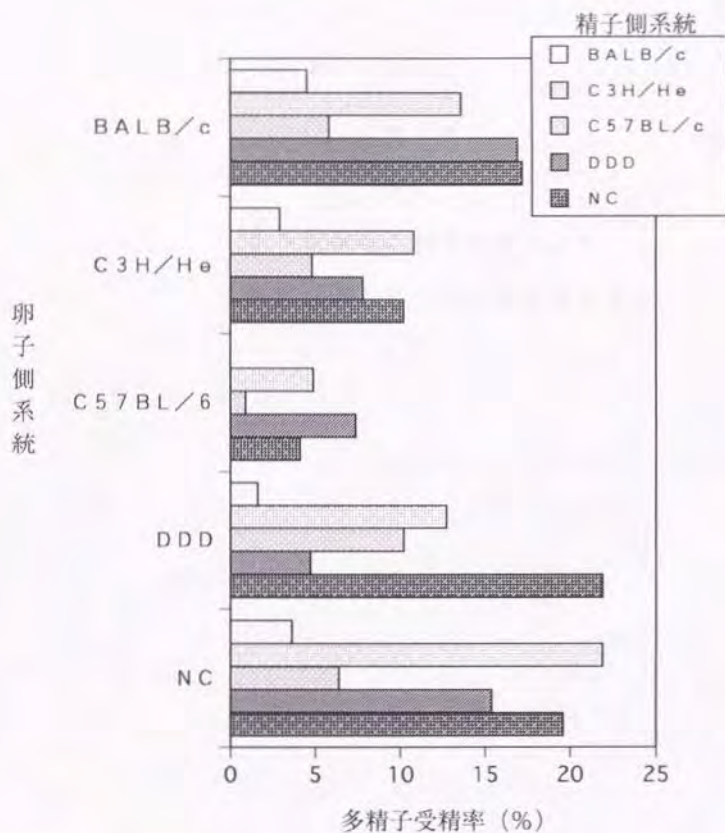


図1-2 5系統の近交系マウスにおける系統内および系統間における多精子受精の関係



## 第 2 章

体外受精および胚移植による

疾患モデルマウスの産仔の作出

第1節 トランスジェニックマウスの体外  
受精・胚移植による産仔の作出

はじめに

クローン化された外来遺伝子を導入して作出されるトランスジェニック(以下はTgと略す)マウスは、導入遺伝子の機能発現を個体レベルで解析する実験系としてだけではなく、新しい疾患モデル動物を開発する手段として期待されている(Jaenisch, 1988; Isola and Gordon, 1991)。著者らは、これまで疾患モデル動物の開発を目的として種々の遺伝子を導入したTgマウスを作出してきた。これらの作出したTg個体については、まずF1個体を得て導入された外来遺伝子の機能発現を調べ、さらに目的に合うものを選抜して系統化を進めて、モデル動物を確立することになる。本

実験では、疾患モデル動物の開発研究の一環として、体外受精による各種のTg疾患モデル系統の個体の作出を検討した。

### 材料および方法

#### 1. 使用動物

著者らが、実中研において作出した10種類のTgマウスを使用した。これらのTgマウスは、自然交配による体内受精卵または体外受精で作製された受精卵の雄性前核に、クローン化した遺伝子DNAを顕微操作で注入し、レシビエント雌の卵管に移植して得た(Hogan et al., 1986; 勝木ら, 1987)。導入遺伝子は、腫瘍モデルのヒト・プロト型 c-Ha-ras 遺伝子 [以後c-Ha-ras] (Saitoh et al., 1990; Katsuki et al., 1992) およびヒト・B型肝炎ウイルス遺伝子[HBV] (Hino et al., 1986)、免疫不全症モデルのヒト・インターロイキン

2 遺伝子 [IL-2] (Katsuki et al., 1989) およ  
びマウス・T細胞抗原レセプター遺伝子  
[TCR] (Bonneville et al., 1989)、高血圧  
モデルのラット・レニン [rREN] (Ohkubo et  
al., 1990) およびラット・アンジオテンシノ  
ーゲン遺伝子 [rANG] (Ohkubo et al., 1990) な  
らびにヒト・レニン [hREN] (Fukamizu et  
al., 1989; Seo et al., 1990; Fukamizu et  
al., 1991) およびヒト・アンジオテンシノー  
ゲン遺伝子 [hANG] (Takahashi et al., 1991;  
Fukamizu et al., 1993)、運動失調モデルの  
マウス・ミエリン塩基性タンパク遺伝子  
[MBP] (Kimura et al., 1989) およびそのア  
ンチセンス型遺伝子 [aMBP] (Katsuki et al.,  
1988) の10種類である。また、これらのTg  
マウスとの体外受精には、BALB/c, C57BL/6,  
C3H/He, B6CF1 (C57B/6 × BALB/c · F1) マウス  
を使用した。さらに、体外受精によって得ら  
れたTg系の胚を移植するためのレシピエント  
雌には、MCH(ICR) マウス(日本クレア)を

用いた。

## 2. 飼育条件

動物の飼育は、第1章・第1節に述べた条件で行った。しかし、導入遺伝子の機能発現のために運動失調を呈してたTg個体には、固形飼料の他に粉末飼料を水で練って与えた。

## 3. 体外受精および培養

体外受精は、豊田ら(1971a)の方法に準じて行った。すなわち、体外受精にはTYH培地を用い、使用に際しては、その0.4 mlをプラスチックシャーレ(35×10mm)に分注して上面をパラフィンオイルに覆い、一晚炭酸ガス培養装置に一晩置いて温度と気相を平衡にさせた。卵子は前述の誘起排卵で得られたものを実験に供した。また、精子は各系統の雄の精巢上体尾部から採取し、パラフィンオイルに覆われたTYH培地に懸濁して1-1.5時間インキュベートした後に媒精に供した。媒精は

精子懸濁液の約10 $\mu\ell$ を、卵子を含む0.4 mlのTYH培地に添加して行った。受精の場の最終精子濃度は100~300/ $\mu\ell$ とした。媒精後はそのままの状態です約24時間培養を継続し、2細胞期に発生したものを受精成立とした。なお、一部のものは、媒精後約6時間の前核期で発生用WM培地(Whitten, 1973)に移し替えて培養を行った。

#### 4. 胚の移植

培養により2細胞期へ発生した胚の一部は、精管切断した雄との不妊交配で偽妊娠を誘起したレシピエント雌(膈栓確認当日:Day 1)の卵管内に移植した。移植胚数は片側の卵管あたり5-10個で、左右で合計14-20個を目処とした。なお、胚を移植したレシピエント雌が予定日に分娩しない場合には、帝王切開を行って産仔を摘出し、あらかじめ別に準備しておいた里親に哺育させた。

## 5. 導入遺伝子の検定

産仔は3-4週齢で離乳した。4-5週齢で尾の一部を切断し、DNAを抽出してサザンブロット解析によって、導入遺伝子を持っているか否かを調べた。

## 成 績

### 1. 作出したトランスジェニックマウスの臨床所見

ヒト・インターロイキン2(IL-2)遺伝子を導入して得られた初代個体に、特徴的な運動失調がみられた(図2-1)。導入遺伝子は、ゲノミックIL-2遺伝子(hIL-2)と、そのプロモーター部位をマウス・メタロチオネイン-1遺伝子と置換したキメラ遺伝子(MThIL-2)であるが(Katsuki et al., 1989)、hIL-2・Tgマウスの初代個体では4匹中の2匹(2♀)が、またMThIL-2・Tgマウスの初代個体では8匹

中の7匹(3♀:4♂)が運動失調を呈した。その他の遺伝子を導入したTgマウスには、とくに外見的な異常は認められなかった。

## 2. 体外受精

各Tg系統の体外受精成績を表2-1~2-6に示した。これらの実験成績は、使用した各雄個体ごとで集計した。MTh1L-2遺伝子を導入した4匹の初代Tg雄からは、まったく精子を得ることができず、世代を継ぐことができなかった。また、ラット・レニン遺伝子にプロモーターとしてマウス・メタロチオネイン-1遺伝子を連結したrREN遺伝子を導入したTg雄から得た精子の受精率は、表2-4に示すように30%以下の低い値であった。この他のTgマウスの体外受精率は、75%以上と安定して高い成績であった。

## 3. 胚移植

体外受精後の培養によって2細胞期まで発



生した胚の移植成績を表 2-7~2-11に示した。移植した胚の産仔への発生率は、同一系統のTgマウスでも実施した実験ごとでバラツキがみられ、30-90%の値であった。また、得られた産仔の約 80%以上のものが離乳された。導入遺伝子の発現などで、産仔への発生率が低下するTg系統はとくに認められなかった。

#### 4. 導入遺伝子の検定

得られた仔への導入遺伝子の伝達を調べた成績を表 2-12 ~2-16に示した。各実験ごとではバラツキがみられたが、全体では期待値どおりメンデルの法則に合うものであった。

#### 考 察

本実験において、1L-2遺伝子を導入した初代個体の中に、生後 10-20日頃に歩行異常や転倒などの特徴的な運動失調を呈する複数の

個体が出現した。同一遺伝子を導入したもので、系統によって症状に差がみられた。これらは注意深い観察を続けながら飼育したが、これ以上の生存が見込めないと判断した時点で、体外受精を行った。また、このTg個体が雌の場合は、卵巣を他の正常雌に移植して産仔を得る方法も併せて実施した。マウス・メタロチオネイン-1遺伝子をプロモーターとして連結したMThIL-2 遺伝子を導入して得られた4系統の雄Tg個体からは、精子を採取できなかったために、世代を継ぐことができなかった。この体外受精と卵巣移植で得られた個体を用いた解析の結果、導入したIL-2遺伝子が生後4日頃から小脳で発現し、小脳組織を破壊するために運動失調が起きることが解明された(Katsuki et al., 1989)。

また、rREN遺伝子を導入して得られたTg雄による体外受精で、著しい受精率の低下が認められた。このrREN遺伝子にも、プロモーターとしてマウス・メタロチオネイン-1遺伝子

が連結されている(Ohkubo et al., 1990)。メタロチオネイン-1遺伝子が連結されたある種の遺伝子は、生後間もない時期に精巣で発現するために、精子形成が阻害されることが窺われた(未発表)。最近、鈴木は(1994)、ラットc-myc 遺伝子にヒト・メタロチオネイン-1遺伝子を連結した遺伝子を導入してTgマウスを作出したところ、雌には何ら異常はみられなかったのに対して、雄は精子形成が阻害されて不稔であったことを報告している。この結果は、本実験の結果とも一致するものである。

一方、その他のTg系統の体外受精率は安定して高いものであり、1匹のTg雄から採取した精子で、1500個を越す胚を一回の実験で作製することも可能であった。また、この胚をレシピエント雌に移植して、150匹以上の仔を得ることもできた。すなわち、材料となる発生段階の揃った胚を必要とするだけ得たり、出生日が同じ動物を計画的に多数作出できる

ことが明らかとなった。

## 第2節 疾患モデル系マウスの体外受精・

### 胚移植による産仔の作出

#### はじめに

疾患モデル動物として使用されているミュータント系は、それ自身が持つ特性ゆえに繁殖能力が低かったり、交尾行動が不能であったりするために、系統の維持や動物の生産が困難であるものが知られている（川俣・松下，1979；川俣・松下，1982；近藤ら，1983；京極，1984）。このような動物のうち、常染色体劣性遺伝のホモ型で疾患を発症して不妊となるミュータント系は、ヘテロ型の雌と雄の交配でホモ型個体を得るのが通常とられている方法である（川俣・松下，1979；川俣・松下，1982；近藤ら，1983；京極，1984）。しかし、この生産方法では、ホモ型・ヘテロ型

・正常型の各個体が同腹仔として混じって生まれるために、疾患発症前にホモ型個体とその他の個体を判別することができない。したがって、胎生期や疾患発症前の時期に、明確にホモ型と判別された個体を用いる実験は不可能である。本研究では、疾患モデル動物として使用されている繁殖障害を伴うミュータント系マウスについて、ホルモン処理による誘起排卵、体外受精による受精卵の作製ならびに胚移植による産仔の作出を検討した。

## 材料および方法

### 1. 使用動物

誘起排卵および体外受精には、筋ジストロフィー症モデルのC57BL/6-dy/dy (図2-1)、肥満症モデルのC57BL/6-ob/ob (図2-2)、運動失調症モデルのBALB/c-rl/rl, BALB/c-shi/shi (図2-3) およびC57BL/6-mld/mld 免疫不全症モデルのBALB/c-nu/nu, C57BL/6

- nu/nu, CB-17-scid/scid, 自己免疫疾患モデルのMRL/MpJ-lpr/lpr, 糖尿病モデルのKKの合計10系統のミュータント系マウスを使用した。これらはすべて実中研で生産されたもので、生後8-16週齢で実験に供した。なお、体外受精によって得られた胚を移植するレシピエント雌には、4元交雑系のMCH(ICR)マウス(日本クレア)を用いた。

## 2. 飼育条件

動物の飼育は、第1章・第1節に述べた条件で行った。しかし、筋ジストロフィー症や運動失調症モデルを発症して行動異常を呈している系統には、固形飼料の他に粉末飼料を水で練って与えた。

## 3. 誘起排卵

各系統の雌に5.0 i. u. のPMSGと5.0 i. u. のhCGを48時間間隔で腹腔内注射し、誘起排卵処置の有用性を検討した。排卵数の観察は、

hCG 注射後15～17時間に卵管膨大部より採取し、体外受精した後に行った。

#### 4. 体外受精

体外受精は、第2章・第1節と同じ条件で行った。

#### 5. 胚の移植

胚の移植も第2章・第1節と同じ条件で行った。得られた産仔はその成長を観察し、さらに外見的に確認できる異常を指標として、各ミュータント系が持っている遺伝的疾患が受け継がれているか否かを調べた。

### 成 績

#### 1. 誘起排卵

PMSG とhCG の処理による各ミュータント系雌の排卵陽性成績とその誘起排卵数を表2



-17 に示した。各系統とも PMSG- hCG 処理によって排卵を誘起することができた。系統別にみると C57BL/6-dy/dy は 65.8%(96/146), C57BL/6-nu/nu が 68.8%(22/32) と低かったが、その他の系統では 80% 以上の高い排卵陽性率であった。排卵した雌個体あたりの平均排卵数は、C57BL/6-dy/dy が 9.8 個ともっとも少なく、また MRL/MpJ-lpr/lpr が 31.3 個と多かった。

## 2. 体外受精

各系統の体外受精成績を表 2-18 に示した。媒精後 6 時間での受精率は、C57BL/6-nu/nu で 60.9%(354/581) ともっとも低い値であったが、その他の系統では 70% 以上の安定した値であった。さらにこれらの受精卵は、培養によって 90% 以上が 2 細胞期胚へと発生した。

## 3. 胚移植

体外受精後の培養によって 2 細胞期まで発

生した胚の移植成績を表 2-19 に示した。胚移植を受けたレシピエント雌の妊娠成立率は 75.0-100%で、全体では 91.5%(75/82)であった。移植胚に対して 39.5-57.7%にあたる産仔が得られた。妊娠の成立したレシピエント雌の約70%は自然分娩したが、予定日の午前中に出産しなかった個体(30%)については帝王切開で仔を摘出し、里親に哺育させた。

#### 4. 産仔の育成と検定

得られた仔の離乳率は、免疫不全症である C57BL/6-nu/nu が 47.6%、BALB/c-nu/nu が 57.8% と、ともに低い値であった。また、筋ジストロフィー症モデルの C57BL/6-dy/dy、肥満症モデルの C57BL/6-ob/ob、運動失調症モデルの BALB/c-rl/rl、BALB/c-shi/shi および C57BL/6-mld/mld の各個体は、生後約 2-3週齢で、それぞれのミュータント系が有している特徴的な疾患の発症が、外見的な観察によって確認され、遺伝的な特徴が正確に受け継

がれていることが知られた。

## 考 察

本実験で使用した疾患モデル系統で、MRL/MpJ-lpr/lpr と KK を除いた各ミュータント系マウスは、いずれも常染色体劣性遺伝のホモ型で疾患を発症する。この中の筋ジストロフィー症モデルの C57BL/6-dy/dy ならびに肥満症モデルの C57BL/6-ob/ob は、生後約 2 週齢から外見的に異常を示し、成熟時に達しても雌、雄ともに交尾不能なために不妊である(川俣・松下, 1979; 近藤ら, 1983; 京極, 1984)。さらに、運動失調症モデルの BALB/c-rl/rl、BALB/c-shi/shi および C57BL/6-mld/mld は、生後約 2 週齢で行動異常を呈して雌、雄とも正常な交尾行動がとれなくなり、ホモ型個体同士の交配では産仔を得ることができない(御子柴, 1984)。しかし、

症状の軽いホモ型個体の中には、正常個体との間で交尾が成立して産仔の得られることもあるが、そのようなことは稀である。したがって、これらの系統では、ヘテロ型の雌と雄を交配して1/4の割合でホモ型個体を得る方法がとられている(御子柴, 1984)。また、この他にはホモ型雌の卵巢を正常雌に移植して、移植卵巢由来のホモ型の産仔を効率的に得ることを目的とした卵巢移植法も報告されている(Tanioka et al., 1973)。

今回の検討で、これらの繁殖障害を伴うミュータント系のホモ型雌でも、PMSGとhCGの投与により排卵を誘起できることが知られた。系統別にみると、C57BL/6-dy/dyにおいては排卵陽性率が65.8%と低く、排卵陽性個体あたりの平均排卵数も9.8個と少なかった。このC57BL/6-dy/dyは、筋ジストロフィー症のために成熟時の8週齢の段階でも体重は15g程度と、極めて発育が不良なために排卵陽性率や排卵数が低いと推察される。この他の系

統では、これらの正常系である BALB/c および C57BL/6 の値 (横山・長谷川, 1989) と比較してほぼ同値か、わずかに低い値であった。

マウスではホルモンに対する反応性は、生後 3～4 週齢の幼若期でもっとも高く、排卵数も多いことが知られている (Zarrow and Wilson, 1961; Wilson and Zarrow, 1962)。このことから、今後これらの系統においても幼若個体による誘起排卵処理の検討が必要と考えられる。一方、各系統のホモ型雄の精巣上体尾部からは、体外受精に使用できる精子を採取することができた。体外受精率についてみると、C57BL/6-dy/dy では平均 71.6% と低い値であった。しかし、その他の系統では 85.7-97.8% と安定した高い成績で、これらの正常系である BALB/c および C57BL/6 の成績 (横山・長谷川, 1991) と比較しても差はなかった。体外受精の後、2細胞期まで培養した胚をレシピエント雌の卵管への移植によって、安定した値で産仔へと発生することが知られ

た。さらにこれらの個体は、各系統特有の異常を示し、それぞれのミュータント系の持っている疾患の特性が正確に受け継がれていることが明らかとなった。著者らは、繁殖障害を伴うミュータント系マウスの生産および系統維持に体外受精の技術が有効に応用できることを報告した（江崎・横山, 1985）。また、鈴木ら（1987）も、肥満性糖尿病のモデルであるC57BL/KsJ-ob/ob マウスを使用して同様の報告を行っている。

著者らは以前、BALB/c-rl/rlおよびBALB/c-shi/shiと正常個体C57BL/6 との間で集合キメラを作製したが（Mikoshiya et al., 1982a; 1982b; Inoue et al., 1986; Terashima et al., 1986）、その当時は体外受精で材料となる8細胞期胚を得ることができなかつたために、人工授精の手法（竹島・豊田, 1977）で胚を採取した。

本研究で検討した体外受精・胚移植の実験系は、これまで不可能であった、明確にミュ

ータント遺伝子をホモ型に持つと保証された疾患発症前の胚や胎仔、新生仔を使用する実験を可能とした(Yokoyama et al., in press)。すでにC57BL/6-dy/dyでは、この体外受精・胚移植の実験系により作成されたホモ個体を使用して、筋ジストロフィー症の発症や病状の進行過程などが組織学的に詳細に調べられ、大きな成果があげられている(埜中ら, 1986; 1987; Arahata et al., 1993)この実験系は、体外受精に使用できる卵子と精子が採取可能なすべての系統に応用可能なので、今後さらに種々の動物実験や動物の生産体制にも有効に活用されることが期待される。

第3節 体外受精・胚移植によるトランス  
ジェニックマウスの遺伝的背景転  
換の短縮

はじめに

外来遺伝子を導入して作出されるトランスジェニック（以下はTgと略す）マウスは、新しいヒト疾患モデル動物の開発につながるものとして期待されている（Isola and Gordon, 1991）。一方、遺伝形質は、単独遺伝子の作用によってのみ発現するものではなく、動物個々の持っている複数の遺伝子すなわち遺伝的背景を基盤としているために、その遺伝的背景の差によっても種々の異なる発現形質を生じるものと考えられる（近藤, 1983）。したがって、作成されたTgマウスについては、導入遺伝子を選択マーカーとして種々の近交



系に戻し交配を行い、遺伝的背景を変えて調べる必要がある。しかし、遺伝的背景を変換するには、少なくとも8代までの戻し交配を行う必要があり、通常行われている交配による方法では、3年近い期間を要することになる。このため、作成されたTgマウスの遺伝的背景を他の近交系に変換するような実験は、ほとんど行われていないのが実情である。本実験では、以上のことを実現するために、導入したヒトインターロイキン2 (hIL-2) 遺伝子を選択マーカーとして、体外受精法を用いて短期間にTgマウスの遺伝的背景を変換することを試みた。

#### 材料および方法

##### 1. 使用動物

近交系のC57BL/6 マウスから得た受精卵にヒトインターロイキン2 (hIL-2) 遺伝子を導

入して作成されたTgマウス(Katsuki et al., 1989) (図 2-4) を実験に供した。このTgマウスは、導入遺伝子の発現によって生後約2週齢で歩行障害や横転などの特徴的な運動失調を呈し、成熟時に達しても交尾行動をとることができないために、雌および雄とも不妊である。しかし、卵巣と精巣の機能は正常であり、未受精卵子と精子をそれぞれ採取して体外受精を行い、胚移植によって産仔を得ることができる。戻し交配を行う相手の系統には、近交系のC3H/Heマウスを使用した。また、体外受精によって得られた胚を移植するレシピエント雌には、4元交配種のMCH(ICR)マウスを用いた。

## 2. 戻し交配の方法

実験に使用したTgマウスは、自然交配が不能であること、ならびに第8代までの戻し交配に要する期間の短縮を図ることから、体外受精による方法をとった。まず、導入された

hIL-2 遺伝子をヘテロ型で持ち、遺伝的背景がC57BL/6 のTg成熟雄とC3H/He成熟雌との間で体外受精を行い、胚移植によって産仔を得た。この場合、産仔は導入遺伝子を持つTg個体とそれを持たないNon-Tg個体が1対1の割合で得られるので、すべての個体から尾の一部を切断しDNAを抽出した後、サザンブロット法による解析でTg個体を決定した。その結果、陽性と判定されたすべてのTgマウスは生後2週齢頃から運動失調を呈したので、以後は生後約2週齢に現れる運動失調を指標として、Tg個体を選抜した。なお、表現型から選抜して実験に供したこれらの個体は、その尾の一部からDNAを抽出し、サザンブロット法によってTgマウスであるか否かを再度確認した。以後の体外受精による戻し交配は、2つの方法によって行った。すなわち、選抜されたTg個体が雌の場合は、生後4.5-7週齢でC3H/He成熟雄との間で体外受精を行い、次世代の産仔を得た。また、雄の場合は、完全に成

熟する3カ月齢を経過した段階で、C3H/He成熟雌との間で同様に体外受精を行って産仔を得た。なお、戻し交配は、期間の短縮を図るためにTg幼若雌を使用して継代する実験を優先して実施したが、この方法で次世代の産仔を得ることができない時にのみ、Tg成熟雄を使用する方法をとった。

### 3. Tgマウスの体外受精

体外受精は、豊田らの方法(1971a)に準じて行った。すなわち、雌に5.0 i. u. のPMSGと5.0 i. u. のhCGを48時間間隔で腹腔内投与して過排卵を誘起し、hCG投与後16-17時間に殺処分して卵管膨大部より、未受精卵を採取した。精子は、雄の精巣上体尾部から採取してTYH培地に懸濁し、受精能獲得のために約1.5時間インキュベートした後、体外受精に供した。卵子は、媒精してから6時間後に第2極体の放出と、雌性および雄性前核の形成を観察し、さらに20時間培養を続けて2細胞

胞期へ発生させた。得られた2細胞期胚は、精管切断雄との不妊交尾で偽妊娠を誘起したレシビエント雌の卵管内に移植し、産仔へ発生させた。

#### 4. 遺伝形質の検査

戻し交配が第8代に達した個体は、生化学標識遺伝子(11遺伝子座)および免疫遺伝学的標識遺伝子(5遺伝子座)を検査し、遺伝的背景がC57BL/6から目的としたC3H/Heに置き替わっているか否かを調べた。

#### 成 績

実験開始から18ヵ月間で、C57BL/6からC3H/Heへの戻し交配を8回行うことができた。このうち3、4、5および7世代目の4回はTg幼若雌個体を、また、1、2、6および8世代目の4回はTg成熟雄個体を用いて継代し

た。この際の体外受精の成績を表 2-20 に示した。2細胞期で判定した受精率には大きなバラツキがみられ、19.5-99.2% 範囲であった。なお、Tg幼若雌を用いた4回の実験の受精率は、49.2-80.2% の値であった。

体外受精によって得られた2細胞期胚の移植成績を表 2-21 に示した。胚を移植されたレシビエト雌の妊娠成立率は、実験群によって50-100%の値であった。移植胚の産仔への発生率には大きな差がみられ、7.4-77.1% の範囲であった。得られた産仔の離乳率は、第6代で57.1% と低い値であったが、その他の実験群では86.5-100%の高い値であった。さらに、得られた産仔への導入遺伝子の伝達は、各世代ではバラツキがみられたが、全体ではTg77個体に対して Non-Tg 75個体とメンデルの法則に沿うものであった。

戻し交配が第8世代に達したTg個体および Non-Tg個体の、生化学的および免疫学的遺伝形質の検査成績を表 2-22 に示した。検査し

た16遺伝子座のうち、14遺伝子座 (*Pep-3*,  
*Ako-1*, *Car-2*, *Mup-1*, *Gpd-1*, *Pgm-1*, *Hbb*,  
*Es-1*, *Mod-1*, *Es-3*, *Igh-C*, *H-2K*, *H-2D*およ  
び *Lyt-1*) はC3H/Heタイプであったが、*Lyt-2*  
および *Hba*ではヘテロ型が観察された。ヘテ  
ロ型を示した2遺伝子座のうち *Ly-2* 遺伝子  
座(第6染色体)は、Tg個体とNon-Tg個体の  
両方でホモ型(a/a) およびヘテロ型(a/b) が  
みられた。また、*Hba* 遺伝子座(第11染色  
体)については、Tg個体8個体のうち7個体  
でヘテロ型(a/c)であったが、Non-Tg個体は  
すべてC3H/Heタイプのホモ型(c/c)であった。

#### 考 察

マウスは、4週齢以前の幼若雌に性腺刺激  
ホルモンを処理することによって容易に過排  
卵を誘起でき(Zarrow and Wilson, 1961;  
Wilson and Zarrow, 1962)、さらにこの卵子

を体外受精した後に移植して高率に産仔を得ることができる(新田ら, 1991; Sugiyama et al., 1992)。したがって、4週齢の幼若雌を使用して体外受精を行い、次世代の産仔を得る実験を繰り返せば、計算上では14ヵ月で8回の戻し交配が可能となる。本実験では、目標としたC57BL/6 からC3H/Heへの8回の戻し交配を、実験開始から18ヵ月間で実施することができた。通常の交配による方法では、順調に進んでも1年間で3-4回の戻し交配に留まることから、第8代目までの戻し交配に要する期間を6ヵ月以上短縮できたことになる。しかし、今回の8回の戻し交配の実験のうち、Tg幼若雌を使用して世代が継げたのは4回のみにとどまった。原因としては、一回の実験に使用できるTg幼若雌の数が少なくなってしまうために、次世代の産仔を得ることができなくなったことにある。この点は、実験規模をさらに大きくして、一回に使用する動物数を増やすことで解決できると考えら



れる。

今回の実験では、体外受精ならびに胚移植の成績は、使用した雌マウスの例数が少なかったこともあって各実験群のバラツキが大きく、著者らが成熟個体を用いて行った成績（横山・長谷川，1989）と比較すると低いものであった。この点についても、実験規模をさらに大きくするなど、今後さらに検討が必要と考える。

遺伝的検査の結果では、*Lyt-2* 遺伝子座で Tg 個体と Non-Tg 個体の両方でヘテロ型が観察されたが、この遺伝子座は他のものに比べて何らかの理由で置き替わりにくかったため、さらに戻し交配を続けることによって変換できると考えられる。また、*Hba* 遺伝子座は Tg 個体のみヘテロ型が観察されたことから、導入した *h1L-2* 遺伝子が C57BL/6 の *Hba* 遺伝子座の近い場所に組み込まれ、選択マーカーとした導入遺伝子と連動していることが推察される。これを確認するためには、*Hba* 遺伝

子の近くに標識となるような遺伝子を持つ系統との間で交配実験を行うのも一つの方法と考えられる。これについては、今後の検討課題である。

一方、ミュータント系やヒト疾患モデル系を系統育成して行くにあたっては、その遺伝的背景の重要性が指摘されている（近藤，1983）。すなわち、ミュータント系などでは、その形質発現にミュータント遺伝子以外の遺伝子群が重要な働きをしており、遺伝的背景の差によって種々の変異を生じる。このことから、ミュータント系であっても近交化しておいたり、そのミュータント遺伝子を種々の近交系に導入して系統を育成することが重要と考えられている（近藤，1983）。

さらに近年、飛躍的に進歩した発生工学の手法によって、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスなど、新しいヒト疾患モデル動物が次々と作成されている（Isola and Gordon, 1991; Tybulewicz, et al., 1992）

これらの新しく作成された系統の遺伝的背景を、短期間で他の近交系に変換することは、今後さらに重要となってくるであろう。本実験で検討した幼若雌を用いた体外受精の実験系は、これらの研究にも大きく貢献できると考えられる。

#### 第4節 小 括

著者らが作出した10種類のトランスジェニックマウスおよび疾患モデル動物として使用されている10系統のミュータントマウスを用いて、体外受精と胚移植により産仔の作出を検討した。

10種類のトランスジェニックマウスのうち、プロモーターとしてマウス・メタロチオネイン-1遺伝子を連結した遺伝子を導入した2種類(MThIL-2およびrREN)の雄で、精子形成に影響がみられた。また、hIL-2遺伝子を導入した個体は、特徴的な運動失調を呈したが、体外受精で胚を作製し、移植により仔を得ることができた。その他のトランスジェニックマウスでは、安定した値で体外受精由来の仔の作出が可能なが知られた。

ミュータントマウスでも、自然交配が不能

あるいは繁殖能力の低い系統においても、計画的に産仔の作出が可能であった。その結果、いままで不可能であった疾患発症前の個体を使用する新たな実験も可能となった。

さらに、未成熟雌から採取した卵子を体外受精し、レシピエント雌に移植して仔を得る実験を繰り返すことによって、トランスジェニックマウスの遺伝的背景を、従来の交配による方法よりも短期間で変換できることが明らかとなった。

表 2-1 トランスジェニックマウスの体外受精：腫瘍モデル

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型 ♂	♀	使用雌数	検査卵数	2細胞期 胚数 (%)
c-Ha-ras	H-2	B6-Tg/-	B6-/-	10	232	223 (96.1)
		B6-Tg/-	B6-/-	20	441	411 (93.2)
		B6-Tg/-	B6-/-	57	943	900 (95.4)
		B6-Tg/-	B6-/-	63	639	605 (94.7)
		B6-Tg/-	B6-/-	100	1394	1269 (91.0)
	H-7	B6-Tg/-	BALB-/-	18	460	351 (76.3)
		B6-Tg/-	BALB-/-	60	1908	1697 (88.9)
		B6-Tg/-	C3H-/-	55	1015	895 (88.2)
		B6-Tg/-	B6C-/-	10	281	256 (91.1)
		B6-Tg/-	B6-/-	30	502	494 (98.4)
H-8	B6-Tg/-	B6-/-	10	178	155 (87.1)	
	B6-Tg/-	B6C-/-	7	167	158 (94.6)	
	B6-Tg/-	B6-/-	10	218	200 (91.7)	
	B6-Tg/-	B6-/-	60	1175	1038 (88.3)	
	HBV	2-2p	C3H-Tg/-	C3H-/-	20	362
C3H-Tg/-			C3H-/-	15	258	242 (93.8)
3-4m		C3H-Tg/Tg	C3H-/-	6	123	114 (92.7)
		C3H-Tg/-	C3H-/-	21	390	356 (91.3)
		C3H-Tg/-	C3H-/-	12	248	242 (97.6)

BALB: BALB/c, C3H: C3H/He, B6: C57BL/6, B6C: C57BL/6 × BALB/c × F1

表 2-2 トランスジェニックマウスの体外受精：免疫不全症モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 使用系統と導入遺伝子型	使用雌数	検査卵数	2細胞期 胚数 (%)
h1L-2	692-5m	B6-Tg/-	B6-/-	3	34	32 (94.1)
		B6-Tg/-	B6-/-	5	106	103 (97.2)
		B6-Tg/-	B6-/-	35	616	586 (95.1)
		B6-Tg/-	B6-/-	4	54	52 (96.3)
		B6-Tg/-	B6-/-	5	94	88 (93.6)
		B6-Tg/-	B6-/-	5	81	81 (100)
	524-2m	B6-Tg/-	B6-/-	10	156	142 (91.0)
		B6-Tg/-	B6-/-	35	537	486 (90.5)
		B6-Tg/-	B6-/-	40	664	625 (94.1)
		B6-Tg/-	B6-/-	20	442	411 (93.0)
		B6-Tg/-	B6-/-	6	161	147 (91.3)
		B6-Tg/-	B6-/-	6	77	77 (100)
MTh1L-2	661-1m	B6-Tg/-	BALB-/-	6	244	233 (95.5)
		B6-Tg/-	C3H-/-	6	77	77 (100)
		B6-Tg/-	B6-/-	6	244	233 (95.5)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	3	38	34 (89.5)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	3	47	38 (80.9)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	5	79	60 (75.9)
	702-9m	B6-Tg/-	B6-Tg/-	7	101	101 (100)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	7	74	72 (97.3)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	1	11	11 (100)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	3	43	38 (88.4)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	4	71	64 (90.1)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	5	91	91 (100)

BALB: BALB/c, C3H: C3H/He, B6: C57BL/6, B6C: C57BL/6 × BALB/c • F1

表 2-3 トランスジェニックマウスの体外受精：免疫不全症モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 導入遺伝子型	使用雌数	検査卵数	2細胞期 胚数 (%)
TCR	1-3m	B6-Tg/-	B6-/-	7	150	137 (91.3)
		B6-Tg/-	B6-/-	13	184	163 (88.6)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	2	58	57 (98.3)
	1-11p	B6-Tg/-	B6-/-	7	110	103 (93.6)
		B6-Tg/-	B6-/-	13	232	223 (96.1)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	1	17	17 (100)
	1-17p	B6-Tg/-	B6-/-	12	213	206 (96.7)
		B6-Tg/-	B6-/-	7	111	107 (96.4)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	2	37	36 (97.3)

B6:C57BL/6



表 2-4 トランスジェニックマウスの体外受精：高血圧症モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 使用系統と導入遺伝子型	使用雌数	検査卵数	2細胞期 胚数 (%)
rREN	56-2p	B6-Tg/-	B6-/-	21	471	131 (27.8)
		B6-/-	B6-Tg/-	2	28	25 (89.3)
	77-5m	B6-Tg/-	B6-/-	8	138	27 (19.6)
		B6-/-	B6-Tg/-	5	83	83 (100)
	82-3m	B6-Tg/-	B6-/-	10	267	40 (15.0)
		B6-/-	B6-Tg/-	6	91	82 (90.1)
	84-4m	B6-/-	B6-Tg/-	12	174	153 (87.9)
		B6-Tg/-	B6-/-	7	162	0 (0)
		B6-/-	B6-Tg/-	5	95	94 (98.9)
		B6-/-	B6-Tg/-	9	166	154 (92.8)
	89-1m	B6-Tg/-	B6-/-	12	273	36 (13.2)
		B6-/-	B6-Tg/-	5	77	74 (96.1)
89-3m	B6-Tg/-	B6-/-	6	144	0 (0)	
91-3p	B6-Tg/-	B6-/-	8	229	2 (0.9)	
	B6-/-	B6-Tg/-	5	77	74 (96.1)	
rANG	59-1p	B6C-Tg/-	B6-/-	6	120	117 (97.5)
	64-6m	B6C-Tg/-	B6-/-	12	251	247 (98.4)
		B6C-Tg/-	B6C-Tg/-	3	57	48 (84.2)
	108-4m	B6C-Tg/-	B6-/-	10	242	238 (98.3)
		B6C-Tg/Tg	B6C-/-	15	375	361 (96.3)
		B6C-Tg/Tg	B6C-Tg/-	8	181	181 (100)
	297-1m	B6C-Tg/-	B6-/-	8	196	174 (88.8)
		B6C-Tg/-	B6-/-	8	196	174 (88.8)

B6:C57BL/6, B6C:C57BL/6 × BALB/c • F1

表 2-5 トランスジェニックマウスの体外受精：高血圧症モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 使用系統と導入遺伝子型	使用雌数	検査卵数	2細胞期 胚数 (%)
hREN	8-8m	B6-Tg/-	B6-/-	10	143	133 (93.0)
		B6-Tg/-	B6-/-	26	266	230 (86.5)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	4	59	52 (88.1)
	8-12p	B6-Tg/-	B6-/-	6	91	86 (94.5)
		B6-Tg/-	B6-/-	20	364	348 (95.6)
		B6-Tg/-	B6-/-	26	266	230 (86.5)
		B6-Tg/-	B6-/-	39	772	686 (88.9)
hANG	2-5p	B6-Tg/-	B6-/-	10	182	158 (86.8)
		B6-Tg/-	B6-/-	30	682	588 (86.2)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	2	22	17 (77.3)
	3-2m	B6-Tg/-	B6-/-	30	760	717 (94.3)
		B6-Tg/-	B6-Tg/-	2	19	15 (78.9)

B6:C57BL/6

表 2-6 トランスジェニックマウスの体外受精：運動失調モデル

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型 ♂	使用系統と導入遺伝子型 ♀	使用雌数	検査卵数	2細胞期 胚数 (%)	
MBP	561-7m	B6-Tg/-	B6-/-	6	203	195 (96.1)	
		B6-Tg/-	B6-/-	6	222	193 (86.9)	
	563-1p	B6-Tg/-	B6-/-	5	128	117 (91.4)	
		B6-Tg/-	B6-/-	14	302	266 (88.1)	
	643-7p	B6-Tg/-	B6-/-	16	365	342 (93.7)	
		B6-Tg/-	B6-/-	10	317	265 (83.6)	
		B6-Tg/-	B6-/-	15	383	341 (89.0)	
		B6-Tg/-	B6-/-	15	383	341 (89.0)	
	aMBP	664-1m	B6-Tg/-	B6-/-	8	157	141 (89.8)
			B6-Tg/-	B6-/-	6	145	137 (94.5)
664-8p		B6-Tg/-	B6-/-	7	187	158 (84.5)	
		B6-Tg/-	B6-/-	9	267	219 (82.0)	
664-9p		B6-Tg/-	B6-/-	6	104	89 (85.6)	
		B6-Tg/-	B6-/-	8	153	118 (77.1)	
		B6-Tg/-	B6-/-	20	449	412 (91.7)	
		B6-Tg/-	B6-/-	8	228	198 (86.8)	
		B6-Tg/-	B6-/-	10	283	254 (89.8)	
		B6-Tg/-	B6-/-	15	376	331 (88.0)	
		B6-/-	3	33	26 (78.8)		
		B6-/-	3	57	51 (89.5)		

B6:C57BL/6, B6C:B57BL/6 × BALB/c F1

表 2-7 体外受精に由来するトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植成績: 腫瘍モデル

導入遺伝子番号	初代個体番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 導入遺伝子型	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数	産仔数 (%) <sup>1)</sup>	雌乳仔数 (%) <sup>2)</sup>
C-Ha-Tas	H-2	B6-Tg/-	B6-/-	48	3/3	26 (54.2)	26 (100)
		B6-Tg/-	B6-/-	64	4/4	39 (60.9)	37 (94.8)
		B6-Tg/-	B6-/-	95	5/6	48 (50.5)	43 (89.6)
		B6-Tg/-	B6-/-	162	8/9	66 (40.7)	62 (93.9)
		B6-Tg/-	BALB-/-	100	6/6	91 (91.0)	90 (98.8)
		B6-Tg/-	BALB-/-	243	13/15	162 (66.7)	152 (93.8)
H-7		B6-Tg/-	B6C-/-	224	14/14	163 (72.8)	157 (96.3)
		B6-Tg/-	B6-/-	48	3/3	29 (60.4)	25 (86.2)
		B6-Tg/-	B6-/-	80	4/5	37 (46.3)	36 (97.3)
H-8		B6-Tg/-	B6-/-	48	3/3	21 (43.8)	19 (90.5)
		B6-Tg/-	B6-/-	80	5/5	43 (53.8)	39 (90.7)
HBV	2-2p	C3H-Tg/-	C3H-/-	60	2/3	25 (41.7)	25 (100)
		C3H-Tg/Tg	C3H-/-	114	6/7	45 (39.5)	45 (100)
		C3H-Tg/-	C3H-/-	30	2/2	14 (46.7)	14 (100)
		C3H-Tg/-	C3H-/-	60	3/3	20 (33.3)	19 (95.0)

BALB: BALB/c, C3H: C3H/He, B6: C57BL/6, B6C: C57BL/6 × BALB/c • F1

1): 移植胚数に対する割合 2): 産仔数に対する割合

表 2-8 体外受精に由来するトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植成績：免疫不全症モデル

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 導入遺伝子型	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数	産仔数 (%) <sup>1)</sup>	離乳仔数 (%) <sup>2)</sup>
hIL-2	692-5m	B6-Tg/-	B6-/-	32	2/2	16 (50.0)	16 (100)
		B6-Tg/-	B6-/-	68	4/4	36 (52.9)	33 (91.7)
	524-2m	B6-Tg/-	B6-/-	32	2/2	19 (59.4)	15 (78.9)
		B6-Tg/-	B6-/-	59	4/4	35 (59.3)	33 (94.3)
		B6-Tg/-	B6-/-	48	3/3	26 (54.2)	21 (80.8)
		B6-Tg/-	B6-/-	67	4/4	40 (59.7)	36 (90.0)
		B6-/-	B6-/-	128	8/8	75 (58.6)	63 (84.0)
		B6-Tg/-	BALB-/-	48	3/3	34 (70.8)	30 (88.2)
		B6-Tg/-	C3H-/-	48	3/3	37 (77.1)	32 (86.5)
		B6-Tg/-	B6C-/-	80	5/5	39 (48.8)	37 (94.8)
MThIL-2	661-1m	B6-/-	B6-Tg/-	32	2/2	16 (50.0)	16 (100)
		B6-/-	B6-Tg/-	59	4/4	35 (59.3)	33 (94.3)
	702-9m	B6-/-	B6-Tg/-	32	2/2	19 (59.4)	15 (78.9)
		B6-/-	B6-Tg/-	48	3/3	26 (54.2)	21 (80.8)
TCR	1-11p	B6-Tg/-	B6-/-	48	3/3	22 (45.8)	19 (86.4)
	1-17p	B6-Tg/-	B6-/-	48	3/3	27 (56.3)	27 (100)
		B6-Tg/-	B6-/-	51	3/3	28 (54.9)	25 (88.3)

BALB: BALB/c, C3H: C3H/He, B6: C57BL/6, B6C: C57BL/6 × BALB/c • F1

1): 移植胚数に対する割合 2): 産仔数に対する割合

表 2-9 体外受精に由来するトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植成績：高血圧症モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 使用系統と導入遺伝子型	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数	産仔数 (%) <sup>1)</sup>	離乳仔数 (%) <sup>2)</sup>
FREN	82-3m	B6-/-	B6-Tg/-	78	5/5	47 (60.3)	42 (88.4)
		B6-/-	B6-Tg/-	94	5/6	43 (45.7)	36 (83.7)
	84-4m	B6-/-	B6-Tg/-	81	4/5	33 (40.7)	31 (93.9)
		B6-/-	B6-Tg/-	96	6/6	47 (49.0)	46 (97.9)
FANG	64-6m	B6C-Tg/-	B6-/-	64	3/4	25 (39.1)	20 (80.0)
		B6C-Tg/-	B6-/-	48	3/3	30 (62.5)	28 (93.3)
	108-4m	B6C-Tg/Tg	B6C-/-	107	6/6	51 (47.7)	45 (88.2)
		B6C-Tg/Tg	B6C-Tg/-	80	4/5	37 (46.3)	31 (83.8)

B6:C57BL/6, B6C:C57BL/6×BALB/c・F1

1): 移植胚数に対する割合 2): 産仔数に対する割合

表 2-10 体外受精に由来するトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植成績：高血圧症モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		移植胚数	妊娠成立数/ レシピエント数	産仔数 (%) <sup>1)</sup>	雌乳仔数 (%) <sup>2)</sup>
		♂	♀				
hREN	8-3mm	B6-Tg/-	B6-/-	48	3/3	23 (47.9)	22 (95.7)
		B6-Tg/-	B6-/-	80	5/5	46 (57.5)	44 (95.7)
	8-12p	B6-Tg/-	B6-/-	50	2/3	18 (36.0)	15 (83.3)
		B6-Tg/-	B6-/-	64	3/4	21 (32.8)	21 (100)
		B6-Tg/-	B6-/-	80	4/5	39 (48.8)	38 (97.4)
hANG	2-5p	B6-Tg/-	B6-/-	60	3/4	22 (36.7)	22 (100)
		B6-Tg/-	B6-/-	80	4/5	37 (46.3)	34 (91.9)
	3-2m	B6-Tg/-	B6-/-	80	5/5	53 (66.3)	50 (84.3)

B6:C57BL/6

1): 移植胚数に対する割合 2): 産仔数に対する割合

表 2-11 体外受精に由来するトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植成績：運動失調モデル

導入遺伝子	初代個体 番号	♂	使用系統と導入遺伝子型	♀	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数	産仔数 (%) <sup>1)</sup>		離乳仔数 (%) <sup>2)</sup>	
MBP	561-7m		B6-Tg/-	B6-/-	33	2/2	21 (63.6)	20 (85.2)		
			B6C-Tg/-	B6C-/-	42	2/3	17 (40.5)	16 (94.1)		
	563-1p		B6C-Tg/-	B6-/-	48	3/3	23 (47.9)	19 (82.6)		
			B6C-Tg/-	B6-/-	40	3/3	24 (60.0)	20 (83.3)		
	643-7p		B6C-Tg/-	B6C-/-	65	3/4	28 (43.1)	25 (88.3)		
			B6C-Tg/-	B6C-/-	32	2/2	22 (68.8)	22 (100)		
			B6C-Tg/-	B6C-/-	56	4/4	30 (53.6)	28 (93.3)		
αMBP	664-1m		B6C-Tg/-	B6-/-	43	3/3	20 (46.5)	17 (85.0)		
			B6C-Tg/-	B6-/-	98	6/6	70 (71.4)	66 (94.3)		
	664-8p		B6C-Tg/-	B6-/-	46	1/3	15 (32.6)	14 (93.3)		
			B6C-Tg/-	B6-/-	61	3/4	23 (37.7)	22 (85.7)		
	664-9p		B6C-Tg/-	B6-/-	32	2/2	19 (59.4)	17 (89.5)		
			B6C-Tg/-	B6C-/-	56	3/3	22 (39.3)	21 (85.5)		
			B6C-Tg/-	B6C-/-	64	3/4	28 (43.8)	25 (89.3)		
			B6C-Tg/-	B6C-/-	64	4/4	36 (56.3)	34 (94.4)		

B6: C57BL/6, B6C: B57BL/6 × BALB/c • F1

1): 移植胚数に対する割合 2): 産仔数に対する割合



表 2-12 体外受精・胚移植によって得られた仔への導入遺伝子の伝達：腫瘍モデル

c-Ha-ras	初代個体 番号	導入遺伝子		使用系統	導入遺伝子型		♀	♂	総数	解析個体						
		♂	♀		Tg/-(♀:♂)	-/(♀:♂)										
c-Ha-ras	H-2	B6-Tg/-	B6-/-	B6-Tg/-	B6-/-	26	12 (5:7)	14 (7:7)								
		B6-Tg/-	B6-/-	B6-Tg/-	B6-/-	37	21 (11:10)	16 (7:9)								
		B6-Tg/-	B6-/-	B6-Tg/-	B6-/-	43	20 (9:11)	23 (9:14)								
		B6-Tg/-	B6-/-	B6-Tg/-	B6-/-	62	34 (13:21)	28 (16:12)								
		B6-Tg/-	BALB-/-	B6-Tg/-	BALB-/-	90	47 (22:25)	43 (20:23)								
		B6-Tg/-	BALB-/-	B6-Tg/-	BALB-/-	152	72 (41:31)	80 (46:34)								
		B6-Tg/-	B6C-/-	B6-Tg/-	B6C-/-	157	70 (38:32)	87 (32:55)								
		B6-Tg/-	B6-/-	B6-Tg/-	B6-/-	25	14 (9:5)	11 (7:4)								
		B6-Tg/-	B6-/-	B6-Tg/-	B6-/-	36	18 (11:7)	18 (10:8)								
		B6-Tg/-	B6-/-	B6-Tg/-	B6-/-	19	8 (4:4)	11 (4:7)								
HBV	2-2p	B6-Tg/-	B6-/-	B6-Tg/-	B6-/-	39	15 (8:7)	24 (16:8)								
		C3H-Tg/-	C3H-/-	C3H-Tg/-	C3H-/-	25	10 (5:5)	15 (7:8)								
		C3H-Tg/Tg	C3H-/-	C3H-Tg/Tg	C3H-/-	45	45 (16:29)									
		C3H-Tg/-	C3H-/-	C3H-Tg/-	C3H-/-	14	7 (2:5)	7 (3:4)								
		C3H-Tg/-	C3H-/-	C3H-Tg/-	C3H-/-	19	11 (5:6)	8 (3:5)								
		.....														
		HBV	3-4m	C3H-Tg/-	C3H-/-	C3H-Tg/-	C3H-/-	19				11 (5:6)	8 (3:5)			
				C3H-Tg/-	C3H-/-	C3H-Tg/-	C3H-/-	14				7 (2:5)	7 (3:4)			
				C3H-Tg/-	C3H-/-	C3H-Tg/-	C3H-/-	19				11 (5:6)	8 (3:5)			

BALB: BALB/c, C3H: C3H/He, B6: C57BL/6, B6C: C57BL/6 × BALB/c × F1

表 2-13 体外受精・胚移植によって得られた仔への導入遺伝子の伝達: 免疫不全症モデル

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		総数	解析個体		
		♂	♀		Tg/-(♀: ♂)	-/(♀: ♂)	
hIL-2	692-5m	B6-Tg/-	B6-/-	16	7 (6: 1)	9 (4: 5)	
		B6-Tg/-	B6-/-	33	17 (6: 11)	16 (9: 7)	
	524-2m	B6-Tg/-	B6-/-	15	6 (4: 2)	9 (3: 6)	
		B6-Tg/-	B6-/-	33	11 (5: 6)	22 (13: 9)	
	B6-Tg/-	B6-/-	21	10 (6: 4)	11 (7: 4)		
	B6-Tg/-	B6-/-	63	30 (18: 12)	33 (18: 15)		
B6-Tg/-	BALB-/-	30	13 (7: 6)	17 (8: 9)			
MThIL-2	661-1m	B6-Tg/-	B6-/-	16	5 (2: 3)	11 (7: 4)	
		B6-/-	B6-Tg/-	33	15 (7: 8)	18 (8: 10)	
	702-9m	B6-/-	B6-Tg/-	15	8 (4: 4)	7 (5: 2)	
		B6-/-	B6-Tg/-	21	8 (5: 2)	13 (7: 6)	
	TCR	1-11p	B6-Tg/-	B6-/-	19	10 (5: 5)	9 (3: 6)
		1-17p	B6-Tg/-	B6-/-	27	16 (5: 11)	11 (4: 7)
		B6-Tg/-	B6-/-	25	11 (6: 5)	14 (8: 6)	

BALB: BALB/c, C3H: C3H/He, B6: C57BL/6, B6C: C57BL/6 × BALB/c • F1

表 2-14 体外受精・胚移植によって得られた仔への導入遺伝子の伝達：高血圧症モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		解析個体		
		♂	♀	総数	Tg/Tg(♀: ♂)	Tg/- (♀: ♂)
TREN	82-3m	B6-/-	B6-Tg/-	42	18 (8:10)	24 (11:13)
		B6-/-	B6-Tg/-	36	28 (11:17)	8 (5: 3)
	84-4m	B6-/-	B6-Tg/-	31	13 (6: 7)	18 (10: 8)
		B6-/-	B6-Tg/-	46	26 (16:10)	20 (8:12)
TANG	64-6m	B6C-Tg/-	B6-/-	20	7 (3: 4)	13 (6: 7)
	108-4m	B6C-Tg/-	B6-/-	28	17 (9: 8)	11 (6: 5)
		B6C-Tg/Tg	B6C-/-	45	45 (20:25)	
		B6C-Tg/Tg	B6C-Tg/-	31	9 (6: 3)	22 (13: 9)

B6:C57BL/6, B6C:C57BL/6×BALB/c・F1

表 2-15 体外受精・胚移植によって得られた仔への導入遺伝子の伝達：高血圧症モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		総数	解析個体	
		♂	♀		Tg/-(♀:♂)	-/(♀:♂)
hREN	8-3m	B6-Tg/-	B6-/-	22	10 (4:6)	12 (5:7)
		B6-Tg/-	B6-/-	44	20 (9:11)	24 (14:10)
	8-12p	B6-Tg/-	B6-/-	21	12 (7:5)	9 (5:4)
		B6-Tg/-	B6-/-	38	17 (6:11)	21 (8:13)
hANG	2-5p	B6-Tg/-	B6-/-	22	14 (7:7)	8 (5:3)
		B6-Tg/-	B6-/-	34	17 (8:9)	17 (11:6)
	3-2m	B6-Tg/-	B6-/-	50	28 (16:12)	22 (10:12)

B6:057BL/6

表 2-16 体外受精・胚移植によって得られた仔への導入遺伝子の伝達：運動失調モデル

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		総数	解析個体	
		♂	♀		Tg/-(♀: ♂)	-/(♀: ♂)
MBP	561-7m	B6C-Tg/-	B6-/-	20	11 (6: 5)	9 (3: 6)
		B6C-Tg/-	B6C-/-	16	9 (5: 4)	7 (5: 2)
	563-1p	B6C-Tg/-	B6-/-	19	9 (6: 3)	10 (6: 4)
		B6C-Tg/-	B6C-/-	20	8 (4: 4)	12 (7: 5)
	643-7p	B6C-Tg/-	B6C-/-	25	13 (8: 5)	12 (6: 6)
		B6C-Tg/-	B6C-/-	22	13 (6: 7)	9 (2: 7)
		B6C-Tg/-	B6C-/-	28	11 (7: 4)	17 (10: 7)
aMBP	664-1m	B6C-Tg/-	B6-/-	17	8 (5: 3)	9 (6: 3)
		B6C-Tg/-	B6C-/-	14	7 (2: 5)	7 (3: 4)
	664-8p	B6C-Tg/-	B6-/-	22	8 (4: 4)	14 (9: 5)
		B6C-Tg/-	B6C-/-	17	6 (2: 4)	11 (4: 7)
	664-9p	B6C-Tg/-	B6-/-	21	11 (5: 6)	10 (6: 4)
		B6C-Tg/-	B6C-/-	25	13 (6: 7)	12 (4: 8)

B6: C57BL/6, B6C: B57BL/6 × BALB/c • F1

表 2-17 疾患モデルとして利用される各種ミュータント系マウスの誘起排卵成績

疾患モデルと しての分類	系 統	使用雌数	排卵陽性雌数 (%)	排卵数 <sup>1)</sup> (平均±SD)
筋ジストロフィー症	C57BL/6-dy/dy	146	96 (65.8)	939 (9.8±9.2)
肥満症	C57BL/6-ob/ob	22	18 (81.8)	231 (12.8±7.1)
運動失調症	BALB/c-r1/r1	22	22 (100)	258 (11.7±4.6)
"	BALB/c-shi/shi	29	28 (96.6)	357 (12.8±5.2)
"	C57BL/6-mld/mld	18	18 (100)	368 (20.4±14.6)
免疫不全症	BALB/c-nu/nu	45	38 (84.4)	581 (15.3±10.3)
"	C57BL/6-nu/nu	32	22 (68.8)	293 (13.3±8.4)
"	CB-17-scid/scid	30	30 (100)	537 (17.9±9.0)
自己免疫疾患	MRL/MpJ-lpr/lpr	40	36 (90.0)	1125 (31.3±16.7)
糖尿病	KK	43	40 (93.0)	768 (19.2±8.2)

1): 排卵陽性雌に対する卵数

表 2-18 疾患モデルとして利用される各種ミュタント系マウスの体外受精成績

系 統	使用雌数	検査卵数	受精卵数 (%) <sup>1)</sup>	2細胞期胚数 (%) <sup>2)</sup>
C57BL/6-dy/dy	146	939	672 (71.6)	653 (97.2)
C57BL/6-ob/ob	22	231	209 (90.5)	202 (96.7)
BALB/c-fl/fl	22	258	221 (85.7)	215 (97.8)
BALB/c-shi/shi	29	357	314 (88.0)	305 (97.1)
C57BL/6-mid/mid	18	368	360 (97.8)	359 (99.7)
BALB/c-nu/nu	43	581	354 (60.9)	328 (92.7)
C57BL/6-nu/nu	22	293	251 (85.7)	243 (96.8)
CB-17-scid/scid	30	537	426 (79.3)	386 (90.6)
MRL/MpJ-lpr/lpr	36	1125	817 (72.6)	747 (91.4)
KK	40	768	538 (70.1)	508 (94.4)

1): 検査卵数に対する割合 2): 受精卵数に対する割合

表 2-19 体外受精に由来する各種ミュートラント系マウスの2細胞期胚の移植成績

系 統	移植胚数	妊娠成立数/ レシピエント数(%)	産仔数 (%) <sup>1)</sup>	離乳仔	
				総数(%) <sup>2)</sup>	(♀:♂)
C57BL/6-dy/dy	209	14/16 (87.5)	82 (39.2)	75 (91.5)	(34:41)
C57BL/6-ob/ob	84	6/6 (100)	46 (54.8)	44 (95.7)	(28:16)
BALB/c-r1/r1	126	8/9 (88.9)	60 (47.6)	56 (93.3)	(31:25)
BALB/c-shi/shi	111	10/10 (100)	64 (57.7)	64 (100)	(23:41)
C57BL/6-m1d/m1d	134	9/10 (90.0)	72 (53.7)	72 (100)	(31:41)
BALB/c-nu/nu	80	5/5 (100)	45 (56.3)	26 (57.8)	(10:16)
C57BL/6-nu/nu	96	6/6 (100)	42 (43.8)	20 (47.6)	(8:12)
CB-17-sc1d/sc1d	128	6/8 (75.0)	58 (45.3)	52 (89.7)	(29:23)
MRL/MpJ-lpr/lpr	112	8/8 (100)	64 (57.1)	55 (85.9)	(23:32)
KK	62	3/4 (75.0)	28 (45.2)	23 (82.1)	(15:8)

1): 移植胚数に対する割合 2): 産仔数に対する割合



表 2-20 体外受精によるC57BL/6を遺伝的背景に持つトランジェニックマウスの  
C3H/Heへの戻し交配：世代別の体外受精成績

戻し交配 回数 (N)	使用した T. g 個体	出生から実験 までの日数	使用雌数	検査卵数	受精卵数 (%)
1	♂	—	6	161	147 (91.3)
2	♂	119	5	118	117 (99.2)
3	♀*	48	3	122	60 (49.2)
4	♀*	48	3	128	87 (68.0)
5	♀*	48	6	174	94 (54.0)
6	♂	107	11	223	43 (19.3)
7	♀*	32	3	86	69 (80.2)
8	♂	106	32	450	371 (82.4)

\*：未成熟雌を使用

表 2-21 体外受精によるC57BL/6 を遺伝的背景に持つトランジニックマウスの  
C3H/Heへの戻し交配 : 世代別の胚移植成績

戻し交配 回数 (N)	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数 (%)	産仔数 (%)	離乳仔数	導入遺伝子の伝達	
					Tg/-(♀:♂)	-/(♀:♂)
1	48	3/3 (100)	37 (77.1)	32	14 (8:6)	18 (9:9)
2	36	2/2 (100)	19 (52.8)	19	9 (5:4)	10 (5:5)
3	58	3/4 (75.0)	12 (20.7)	12	5 (3:2)	7 (3:4)
4	87	2/3 (66.7)	23 (26.4)	23	16 (6:10)	7 (5:2)
5	90	4/5 (80.0)	26 (28.9)	23	9 (1:8)	14 (3:11)
6	39	1/2 (50.0)	7 (17.9)	4	3 (3:0)	1 (0:1)
7	68	2/4 (50.0)	5 (7.4)	5	3 (1:2)	2 (1:1)
8	90	5/6 (83.3)	35 (38.9)	34	18 (7:11)	16 (6:10)

表 2-22 C57BL/6を遺伝的背景を持つトランスジェニックマウスをC3H/Heへ  
戻し交配したさいの第8代目の個体における遺伝的検査成績

Strain	Chromosome No. & Locus																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	17	19					
C57BL/6N	a	a	a	b	a	b	s	a	b	a	a	b	b					
C3H/HeN	b	b	b	a	b	a	d	b	a	c	a	b	b					
N8:C3H × T8	b	b	b	a	b	ab	d	b	a	ac	a	k	a					
	b	b	b	a	b	a	d	b	a	ac	a	k	a					
	b	b	b	a	b	a	d	b	a	ac	a	k	a					
	b	b	b	a	b	ab	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	ab	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	a	d	b	a	ac	a	k	a					
	b	b	b	a	b	ab	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	a	d	b	a	ac	a	k	a					
N8:C3H × Non-T8	b	b	b	a	b	ab	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	a	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	a	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	a	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	ab	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	ab	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	a	d	b	a	c	a	k	a					
	b	b	b	a	b	a	d	b	a	c	a	k	a					



図2-1 ヒトインターロイキン2 (hIL-2)  
遺伝子導入マウス  
歩行障害や横転を呈する



図2-2 筋ジストロフィーモデルマウス  
C57BL/6-dy/dy



図 2 - 3 肥満症モデルマウス  
C57BL/6-ob/ob



図2-4 運動失調症モデルマウス  
BALB/c-shi/shi

### 第 3 章

#### 凍結保存した精子および

#### 胚からの産仔の作出



第1節 凍結保存精子の体外受精による  
産仔の作出

はじめに

マウス胚の凍結保存技術は、各種の系統を安全に、また省力化したかたちで保存するために有効に使われはじめている。しかし、初期胚はすでに定まった遺伝子組成を有しているため、融解後に新たな遺伝的組み合わせで個体を作成することができない。そこで未受精卵と精子の凍結保存が可能であれば、この問題も解決すると考えられてきた。マウス未受精卵の凍結保存については、Whittingham (1977), Nakagata (1989), Kohno et al., (1989)の報告があり、凍結卵を体外受精した後、移植して正常な産仔が得られている。

また、マウス精子の凍結保存は、竹島ら、

(1982)によってその可能性が示され、1991年に著者らを含めて3グループが初めて産仔の作出を報告した(奥山ら, 1990; Tada et al., 1990; 横山ら, 1990)。本実験では、系統保存に応用できるマウス精子の凍結保存技術の確立を目的に、凍結保存液の検討を行い、さらに筋ジストロフィー症モデルのC57BL/10-mdx/mdxを用いて検討を行った。

## 材料および方法

### (実験 I)

#### 1. 凍結保存液

Dulbecco's PBS液(Gibco)に凍害保護剤として10%および15%の濃度でラフィノースを溶解し、これに3, 5, 10および15%グリセリン、5, 10 および15%ジメチルスルホキシド(DMSO)あるいは5 および10%スキムミルクを加えて保存液とした。

## 2. 精子の採取

B6CF1 (C57BL/6×BALB/c・F1) 成熟雄マウス (12~20週齢) から摘出した精巣上体尾部を、ホールガラスの保存液 0.4ml 中でノエス剪刀を用いて細切して精子を採取した。この精子液の 0.2ml をクライオチューブ (1.8ml) に分注し、凍結保存に供した。

## 3. 凍結・融解および精子懸濁液の作成

冷却はドライアイス・アルコール法を用いた。室温から 4℃ 間を 1℃/分、4~-80℃ 間を 10℃/分の速度で冷却し、-80℃ でクライオチューブを液体窒素中に浸漬して 1-120 日間保存した。融解はクライオチューブを液体窒素から取り出し、室温下に静置することによって行った。-70~0℃ 間の温度上昇速度は 10℃/分であった。室温に温度が達した後、同温の 0.2ml 新鮮 PBS 液を加え、×100 0:5 分の遠心の後、上清を捨て、再度 0.2ml の PBS 液を加えて遠心処理をし、凍害保護剤

を除去した。これに0.4mlのTYH液を加え、この0.1mlをプラスチックシャーレ内のパラフィンオイルで被われた0.3ml TYH液に再浮遊し、精子懸濁液とした。このプラスチックシャーレを実体顕微鏡下の37℃保温盤上に移し、家畜精子の方法に準じて精子の生存率と運動力を観察し、生存指数を求めた。さらに炭酸ガス培養装置内でインキュベートし、1時間および2時間後の状態を検査した。良好な生存性が確認された精子については、インキュベート後1時間のサンプルを用いて体外受精を行い、その受精能を検討した。

#### 4. 体外受精

体外受精は第2章・1節に述べた方法に準じて行った。すなわち、卵子は、B6CF1 雌にPMSGとHCG処理で排卵誘起し、hCG注射後15-17時間に卵管膨大部から採取した。媒精はパラフィンオイル下の卵子を含む0.4ml TYH液に、融解後1時間インキュベートした

精子懸濁液の10~20  $\mu$ l を添加して行った。  
卵子は媒精後6時間に倒立顕微鏡下で、第2極体の放出と雌性および雄性前核の形成を指標として受精成立の有無を検査した。その後さらに18時間培養し、2細胞期への発生を調べた。

#### 5. 胚の移植

培養によって正常な2細胞期に発生した胚は、精管結紮雄との不妊交尾で偽妊娠を誘起したDay 1 (膈栓確認当日)のMCH(ICR)レシピエント雌の卵管内に移植した。移植胚数は片側当たり5-7個とした。

#### (実験Ⅱ)

実験Ⅱでは、実験Ⅰの方法に改良を加えて成績の向上化を図った。

#### 1. 凍結保存液

凍害保護剤として2糖類のシュークロース(分子量:342.3)と3糖類のメレジトース

(504.4)、ラフィノース(504.4)を用いた。使用にあたり、シュクロースは10%、メレジットースとラフィノースは18%濃度に超純水に溶解し、これにスキムミルクを3%濃度に混合した。さらに遠心処理(10,000g; 15分)した後、上清を濾過して保存液とした。

## 2. 精子の採取と凍結保存

B6C3F1、C57BL/10およびC57BL/10-mdx/mdxの成熟雄を殺処分して、精巣上体尾部から精子を採取した。この精子を50 $\mu$ l保存液に懸濁し、クライオチューブに入れて凍結した。冷却はチューブを液体窒素保管器のガス中に10分間保持して行い、その後一定期間、液体窒素中に保存した。この条件での冷却速度は、30-40  $^{\circ}$ C/分と推測された。

## 3. 融解と体外受精

チューブを液体窒素中から取り出して、室温に静置して融解した。融解した精子懸濁液

の10 $\mu$ lを、プラスチックシャーレ内のパラフィンオイルで被った0.4 mlのTYH培地に静かに加え、精子の生存性を経時的に観察した。

体外受精は、1時間インキュベートした精子液に、誘起排卵処理で得た卵子を導入して行った。媒精後約6時間に受精を観察し、さらに18-20時間培養を行い、2細胞期胚への発生を調べた。

#### 4. 胚の移植

胚の移植は前述と同様に行った。

### 成 績

#### (実験 I)

凍結マウス精子の生存率に及ぼすフィノース、グリセリン、DMSOおよびスキムミルクの効果について調べた結果を表 3-1に示した。ラフィノース濃度は10および15%とし、これ

に種々の濃度にグリセリン、DMSOあるいはスキムミルクを加えたが、ラフィノース濃度は10%の方が良好な結果が得られた。すなわち、グリセリン添加群では、10%ラフィノース・5%グリセリンの組み合わせで、融解直後50という最も高い精子生存指数が得られた。また、DMSO添加群では、10%ラフィノース・5%および10%DMSOの組み合わせで、40の生存指数が得られた。しかし、スキムミルク添加群は、他群より著しく低く、最も高い組み合わせでも15という値であった。融解直後の生存指数は、その後の培養によって時間経過とともに低下した。

凍結マウス精子による体外受精成績を表3-2に示した。表3-1の成績に従ってグリセリン添加群では5%グリセリン・10%ラフィノース、DMSO添加群では10%DMSO・10%ラフィノースの組み合わせの凍結精子を体外受精に供した。実験により受精率にバラツキがみられたが、それぞれの検査卵総数でみると、受精



率はグリセリン添加群で37.0% (37/100)、DM  
SO添加群では19.4% (36/186)という値であっ  
た。受精卵と判定されたこれらのものは、培  
養によってすべて正常な2細胞期胚へと発生  
した。

体外受精由来の2細胞期胚の移植成績を表  
3-3 に示した。グリセリン添加群では2匹の  
レシピエントがともに妊娠し、移植胚の75.  
0%にあたる21匹 (♀13 : ♂8)の産仔が得られ  
た。また、DMSO添加群では3匹のレシピエン  
トのうち1匹が妊娠し、移植胚の16.7% 5匹  
(♀2 : ♂3)の産仔が得られた。なお、得  
られた産仔に異常は認められず全例(26匹)  
とも離乳された後、成体に育った。また、そ  
の後の交配実験においても、正常な繁殖能力  
のあることが確認された。

以上の結果から、基準液としたDulbecco's  
PBS液に凍結保護剤としてラフィノースとグ  
リセリンあるいはDMSOを組み合わせて用いる  
ことにより、マウス精子の凍結保存が可能で

あることが明らかとなった。

(実験Ⅱ)

3種類の保存液によるB6C3F1マウス精子の融解後の生存性の結果を表3-4に示した。生存性は、融解10分で50-70%ともっとも高く、時間も経過とともに低下した。

3系統の凍結精子による体外受精成績を表3-5に示した。卵子は各群ともB6C3F1マウスから得たものを使用した。受精率はC57BL/10-mdx/mdxで57.1%、C57BL/10で52.7%ならびにB6C3F1で62.7%であった。これらの値は、対照群とした未凍結処理精子よりも30-40%低かった。凍結精子から得られた受精卵の2細胞期胚への発生率は86.7-96.0%で、対照群と差はみられなかった。

凍結精子によって得られた2細胞期胚の移植成績を表3-6に示した。胚を移植したレシビエントの中、C57BL/10-mdx/mdx群とB6C3F1群で各1匹が妊娠不成立であった。移植胚あたりでみた産仔への発生率は、46.9-65.2%で

あった。

#### 考 察

マウス精子の凍結保存を成功に導いた要因の一つとして、ラフィノースを凍結保護剤として使用したこと（永瀬，1970）があげられる。ラフィノースは3糖類で、ウシ精子錠剤化凍結法に用いられ、良好な保護効果のあることが認められている（永瀬，1970）。この場合には18%濃度で実験に使用されている。本実験の予備実験として行った凍結マウス精子におよぼすラフィノース濃度（3%濃度グリセリン添加）では、10%濃度が生存指数40と最も高く、同様に15%が35、20%が10という値であった。さらに、本実験で得られた融解後の精子の生存率は、体外受精によって受精させるに充分であることが、示された。凍結保存期間については、生存率に大きな差の

ないことも明らかとなった（未発表）。

実験Ⅱでは、とくに保存液の組成と凍結・融解法に改良を加えた。要点は、保存液による精子の希釈率を多くせず、凍結し、融解後は凍害保護剤を除かずに精子浮遊液の少量を直接受精用培地に添加することである。これによって、精子の生存性と運動性の低下を、大幅に防ぐことができた。

以上のとおり、未受精卵の凍結と併せて用いることにより、今後は配偶子を凍結保存し、実験計画に従って融解した後、任意の組み合わせによる体外受精を行えることが明らかとなった。今後は初期胚の凍結保存とともに、配偶子凍結保存が可能になり、系統保存だけでなく、種々の遺伝的組み合わせのマウスを、配偶子を融解した後、体外受精を行って得ることが出来るようになり、貴重な野生マウスの遺伝資源の保存という観点からも重要な手段となるものと考えられる。

## 第2節 トランスジェニックマウスおよび ミュータントマウスの胚の凍結保 存

### はじめに

マウス胚の凍結保存技術は、ミュータント系を含む一部の系統保存に実用化されているだけでなく、つぎつぎに作られてくるトランスジェニックマウス胚の保存に有効に使われはじめている。マウス初期胚の凍結保存の有効性は、以下の点にあると考えられる。

第一に、個体による系統保存は遺伝的変異を生じ真の対象となる遺伝子保存にならないのに対し、凍結保存は遺伝的変異を生じない。第二に、動物飼育に要するスペース、費用、人手等が節約され合理的であり、計画的に個体に戻すことができる。第三に、液体窒素

(LN<sub>2</sub>: -196℃) に保存されている限り、病原菌等による汚染から守られる。第四に、輸送が簡便である。本実験では、第2章で体外受精と胚移植によって、繁殖障害を伴うトランスジェニックマウスとミュータントマウスを含む、各種系統の継代維持と動物の計画的な生産が可能となったことを踏まえ、トランスジェニックマウスおよびミュータントマウスの胚の凍結保存と融解胚の移植による産仔の作出を検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 使用動物

実験に用いたトランスジェニックマウスは、第2章・第1節で使用したものと同一のものである。また、ミュータントマウスは、第2章・第2節で使用したものに、さらに筋ジストロフィー症モデルのC57BL/10-mdx/mdx、運

動失調症モデルのC57BL/6-shi/shi、免疫不全症モデルのCBA-nu/nu および糖尿病モデルのNODの4系統を加えた。これらの系統は、実中研において生産されたものである。また、胚移植を行うレシピエント雌も、前述の4元交雑系MCH(ICR)を使用した。

## 2. 飼育条件

動物の飼育は、第2章・第1節および第2節と同様の条件で行った。

## 3. 体外受精

体外受精は、第2章・第1節に述べた条件で行った。

## 4. 胚の凍結と融解

体外受精によって作製された2細胞期胚は、Whittingham et al., (1972)の方法に修正を加えた著者ら(Yokoyama et al., 1981)の手法により行った。すなわち、20-60個の2細胞

胞期胚を0.1ml PBI 培地(Whittingham, 1974)の入ったクライオチューブ(1.8ml)に移し、DMSOを最終濃度が1モルになるように室温下で添加した。このチューブを4℃下で10分間平衡した後に0℃のアルコールバス中に移し、ドライアイスにより-7℃まで0.5℃/分の速度で冷却した。-7℃で植氷処理を行い、5分間放置後、-70℃まで0.5℃/分の速度で冷却した。さらにこのチューブは、液体窒素中(-196℃)に浸漬して、一定期間保存した。融解は、チューブを液体窒素中から取り出し、室温下に静置することによって行った。この場合の温度上昇速度は、10℃/分であった。完全に融解後に、チューブに新鮮PBI培地を加えてDMSOを希釈し、内容液をプラスチックシャーレに移して胚を回収した。回収胚は、形態的な観察を行い、正常と判定したものを移植に供した。

##### 5. 胚の移植



胚移植は、第2章・第1節に述べた方法で行った。

#### 6. 導入遺伝子の検定

トランスジェニックマウスの導入遺伝子の検定は、第2章・第1節に述べた方法で行った。

### 成 績

#### 1. トランスジェニックマウス胚の

##### 凍結保存

トランスジェニックマウス2細胞期胚の凍結・融解成績を表3-7~3-14に示した。

これらの成績は、融解を行った実験ごとに集計した。融解された胚は、90%以上が回収され、凍結胚に対して70%以上のものが形態的に正常胚として得られた。

正常胚の移植成績を表3-15~3-22に示した。

各実験群により、バラツキがみられるものの、移植胚の約30-90%が産仔へと発生した。凍結胚から得られた仔への導入遺伝子の伝達を調べた成績を、表 3-23 ~3-30に示した。これも各実験群によりバラツキがみられるが、ほぼ1対1の値で、メンデルの法則に合うものであった。

## 2. ミュータントマウス胚の凍結保存

ミュータントマウスの2細胞期胚の凍結・融解成績を表 3-31 に示した。これらは、複数回の実験成績をまとめて示した。融解された胚は、90%以上が回収され、凍結胚に対して75%以上が形態的に正常と判定された。各系統間には、差はみられなかった。

正常胚の移植成績を表 3-32 に示した。移植胚に対して、35-55%が産仔へと発生した。離乳率は、免疫不全症のC57BL/6-nu/nu、CBA-nu/nu およびBALB/c-nu/nuで38-59%と低い値であった。

## 考 察

トランスジェニックマウスおよびミュートマウスのいずれの系統とも、胚の凍結・融解後の生存性は高く、移植胚は再現性のある値で産仔に発生することが明らかとなった。また、第2章で検討された遺伝的背景が同一のもの、ならびに表3-33に示した正常系統の成績と比較してみても、遜色のない値であった。

なお、ミュートマウスのなかの、免疫不全症モデルであるヌードマウスで離乳率が低かったが、これらの系統は、本来低い傾向にあることから、凍結保存の影響によるものではないと考えられる。

トランスジェニックマウス胚の凍結保存期間は、2-1325日に及んだが、生存性および産仔への発生に及ぼす影響は認められなかった。

Lyon et al., (1981)は、胚の長期間保存を行う際の生存性に関与するものの一つとして、放射線の影響を考えたが、自然状態での線量では、半永久的に安全であることを報告している。

著者ら(Itoh et al., 1992)は、ジャクソン研究所から導入したMRL/MpJ-lpr/lpr マウスの系統育成を行っている途中で、そのコロニーのすべての動物が免疫グロブリンのIgG1を欠損していることに気がついた。この系統については、各世代で胚の凍結保存を行っていたので、凍結胚を融解して個体を作出したところ、異常は認められず、系統育成の何処かで変異の生じたことが判明した。胚凍結によって系統を立て直すことができた一つの例である。

### 第3節 小 括

遺伝資源の保存を目的として、マウス精子および体外受精由来の2細胞期胚の凍結保存を検討し、技術の確立と実用化を図った。

マウス精子を、凍害保護剤としてラフィノースとグリセリン、DMSOまたはスキムミルクを含む保存液に懸濁することによって、凍結保存が可能となった。この凍結保存精子を用いて体外受精を行い、胚を移植して正常産仔を得ることができた。また、凍結・融解法に改良を加え、精子の生存性と運動性を向上させることができた。

トランスジェニックマウスおよびミュータントマウスとも、凍結・融解した2細胞期胚の70-100%が形態的に正常な生存として得られ、移植によって30-90%のものが産仔に発生した。トランスジェニックマウスでは、胚の

保存期間は2-1325日に及んだが、期間の延長が胚の生存性や各個体の遺伝形質の変化等に及ぼす影響は認められなかった。また、導入した遺伝子は、メンデルの法則に沿う値で仔に伝達されていた。ミュータントマウスでも、各系統の遺伝的特性が変化することなく保持されていることが示された。これによって、貴重な遺伝資源を、安全かつ経済的に保存できることが明らかとなった。

表 3-1 凍結マウス精子の生存性におよびすラフィノース、グリセリン、DMSO およびスキムミルクの効果

凍害保護剤	生存性(%)					
	10% ラフィノース			15% ラフィノース		
	融解直後	1	2(hr)	融解直後	1	2(hr)
グリセリン	3%	40	40	40	35	30
	5%	50	40	35	40	10
	10%	5	5	1	30	15
	15%	<1	<1	<1	<1	<1
DMSO	5%	40	15	10	35	30
	10%	40	30	25	35	30
	15%	<1	<1	<1	<1	<1
スキムミルク	5%	10	15	15	<1	5
	10%	<1	<1	<1	<1	<1

表 3-2 凍結マウス精子による体外受精成績

凍害保護剤	実験 No.	検査卵数	受精卵数 (%)	2細胞期 発生胚数
10% ラファイノース + 5% グリセリン	1	62	13 (21.0)	13
	2	20	9 (45.0)	9
	3	18	15 (83.3)	15
	合計	100	37 (37.0)	37
.....				
10% ラファイノース + 10% DMSO	1	58	6 (10.4)	6
	2	56	4 (7.2)	4
	3	72	26 (36.1)	26
	合計	186	36 (19.4)	36



表 3-3 凍結マウス精子を用いた体外受精由来の2細胞期胚の移植成績

凍害保護剤	レシビエント No.	移植胚数	産仔数 (%)	離乳仔数 (♀:♂)
10% ラファイノース + 5% グリセリン	1	13	11 (84.6)	11 (6:5)
	2	15	10 (66.7)	10 (7:3)
	合計	28	21 (75.0)	21 (13:8)
.....				
10% ラファイノース + 10% DMSO	1	6	5 (83.3)	5 (2:3)
	2	12	0	0
	3	12	0	0
	合計	30	5 (16.7)	5 (2:3)

表 3-4 B6C3F1マウス精子の凍結・融解後の生存指数

	融解後の生存性 (%)				
	10分後	1時間	2時間	3時間	6時間
シュークロース	50	40	35	35	35
ラフィノース	70	65	55	55	55
メレジトース	65	55	50	50	50

(3%スキムミルクを含む)

表 3-5 凍結精子の体外受精成績

系 統	処 置 (精 子)	検 査 卵 数	受 精 卵 数 (%)	2 細胞 胚 数 (%) <sup>1)</sup>
B10-mdx/mdx	凍 結	154	88 (57.1)	79 (89.8)
	未凍結	79	66 (83.5)	59 (89.4)
B10	凍 結	186	98 (52.7)	85 (86.7)
	未凍結	48	45 (93.8)	41 (91.1)
B6C3F1	凍 結	241	151 (62.7)	145 (96.0)
	未凍結	280	263 (93.9)	241 (91.6)

卵子：各群ともB6C3F1のものを使用 1)：受精卵に対する割合

表 3-6 凍結精子より得られた体外受精卵の移植成績

系 統	移植胚数	レシビエント数		産仔数 (%)
		使用数	妊娠成立(%)	
B10-mdx	64	4	3 ( 75. 0 )	30 (46. 9)
B10	66	4	4 (100 )	43 (65. 2)
B6C3F1	105	7	6 ( 85. 7 )	52 (49. 5)

卵子：各群ともB6C3F1のものを使用

表 3-7 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の融解後の生存性: 腫瘍モデル(1)

導入遺伝子 番号	初代個体 番号	♂	使用系統と導入遺伝子型	♀	凍結胚数	回収胚数	形態的正常 胚数 (%) <sup>1)</sup>	保存期間 (日)
c-Ha-ras	H-2		B6-Tg/-	B6-/-	34	33	30 (88.2)	8
			B6-Tg/-	B6-/-	40	40	38 (95.0)	16
			B6-Tg/-	B6-/-	120	118	93 (77.5)	124
			B6-Tg/-	B6-/-	180	178	155 (86.1)	618
	合計			374	369	316 (84.5)		
			BALB-/-	BALB-/-	120	117	97 (80.8)	77
			B6-Tg/-	BALB-/-	240	226	198 (82.5)	78
			B6-Tg/-	BALB-/-	540	485	449 (83.1)	112
			B6-Tg/-	BALB-/-	816	725	656 (80.4)	205
	合計			1716	1553	1400 (81.6)		
H-7		B6-Tg/-	B6-/-	40	40	34 (85.0)	38	
		B6-Tg/-	B6-/-	166	166	128 (77.1)	130	
	合計			206	206	162 (78.6)		
H-8		B6-Tg/-	B6-/-	100	91	69 (69.0)	112	
		B6-Tg/-	B6-/-	300	285	254 (84.7)	332	
		B6-Tg/-	B6-/-	248	237	225 (90.7)	339	
	合計			648	613	548 (84.6)		

1): 凍結胚に対する割合

表 3-8 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の融解後の生存性：腫瘍モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統	♀ 導入遺伝子型	凍結胚数	回収胚数	形態的正常 胚数 (%) <sup>1)</sup>	保存期間 (日)
HBV	2-2p	C3H-Tg/-	C3H-/-/-	90	88	77 (85.6)	2
	3-4p	C3H-Tg/-	C3H-/-/-	56	55	43 (76.8)	2

1):凍結胚に対する割合

表 3-9 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の融解後の生存性：免疫不全症モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 凍結胚数	回収胚数	形態的正常 胚数 (%) <sup>1)</sup>	保存期間 (日)
h1L-2	524-2m	B6-Tg/-	B6-/-	30	29 (96.7)	6
		B6-Tg/-	B6-/-	28	28 (100)	6
		B6-Tg/-	B6-/-	137	137 (85.4)	15
		B6-Tg/-	B6-/-	50	48 (76.0)	16
		B6-Tg/-	B6-/-	100	89 (89.0)	24
		B6-Tg/-	B6-/-	35	33 (94.3)	28
		B6-Tg/-	B6-/-	34	30 (88.2)	33
		B6-Tg/-	B6-/-	72	71 (98.6)	53
		B6-Tg/-	B6-/-	56	48 (85.7)	80
		B6-Tg/-	B6-/-	21	20 (95.2)	87
		B6-Tg/-	B6-/-	60	53 (88.3)	96
		B6-Tg/-	B6-/-	56	46 (82.1)	226
		B6-Tg/-	B6-/-	90	89 (98.7)	244
		B6-Tg/-	B6-/-	69	67 (97.1)	328
		B6-Tg/-	B6-/-	90	81 (90.0)	522
		B6-Tg/-	B6-/-	77	74 (96.1)	558
合計			1005	986	890 (88.6)	

1):凍結胚に対する割合

表 3-10 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の融解後の生存性：免疫不全症モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂		♀		回収胚数	形態的正常 胚数 (%) <sup>1)</sup>	保存期間 (日)
		使用系統	導入遺伝子型	凍結胚数	凍結胚数			
h1L-2	692-5m	B6-Tg/-	B6-/-	35	34	31 (88.6)	33	
		B6-Tg/-	B6-/-	40	38	36 (90.0)	116	
合計				75	72	67 (89.3)		
MTh1L-2	661-1m	B6-/-	B6-Tg/-	37	37	35 (94.6)	16	
		B6-/-	B6-Tg/-	28	26	21 (75.0)	58	
		B6-/-	B6-Tg/-	30	30	27 (90.0)	88	
		B6-/-	B6-Tg/-	30	29	27 (90.0)	135	
合計				125	122	110 (88.0)		
702-9m		B6-/-	B6-Tg/-	30	30	28 (93.3)	94	
		B6-/-	B6-Tg/-	30	29	25 (83.3)	94	
		B6-/-	B6-Tg/-	30	30	26 (86.7)	132	
合計				90	89	79 (87.8)		

1): 凍結胚に対する割合



表 3-11 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の融解後の生存性: 免疫不全症モデル(3)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型 ♂	♀	凍結胚数	回収胚数	形態的正常 胚数 (%) <sup>1)</sup>	保存期間 (日)
TCR	1-11p	B6-Tg/-	B6-/-	40	40	31 (77.5)	33
		B6-Tg/-	B6-/-	40	38	36 (90.0)	116
合計				80	78	67 (83.8)	
-	1-17p	B6-Tg/-	B6-/-	40	40	38 (95.0)	28
		B6-Tg/-	B6-/-	40	40	32 (80.0)	420
		B6-Tg/-	B6-/-	34	34	28 (82.4)	454
合計				114	114	98 (86.0)	

1): 凍結胚に対する割合

表 3-12 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の融解後の生存性；高血圧症モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		凍結胚数	回収胚数	形態的正常 胚数 (%) <sup>1)</sup>	生存期間 (日)
		♂	♀				
rREN	82-8m	B6-Tg/-	B6-/-	16	16	15 (93.8)	36
		B6-Tg/-	B6-/-	44	44	43 (97.7)	56
		B6-Tg/-	B6-/-	37	36	35 (94.6)	413
合計				97	96	93 (95.9)	
84-4m		B6-Tg/-	B6-/-	86	82	78 (90.7)	46
		B6-Tg/-	B6-/-	80	75	66 (82.5)	102
		B6-Tg/-	B6-/-	97	94	87 (89.7)	361
合計				263	251	231 (87.8)	
rANG	64-6m	B6C-Tg/-	B6-/-	27	27	22 (81.5)	66
		B6C-Tg/-	B6-/-	40	36	32 (80.0)	113
		合計				67	63
108-4m		B6C-Tg/-	B6-/-	62	60	55 (88.7)	52
		B6C-Tg/-	B6-/-	40	40	36 (90.0)	151
		合計				102	100

1): 凍結胚に対する割合

表 3-13 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の融解後の生存性：高血圧症モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型 ♂	♀	凍結胚数	回収胚数	形態的正常 胚数 (%) <sup>1)</sup>	保存期間 (日)
hREN	8-3m	B6-Tg/-	B6-/-	40	39	32 (80.0)	105
		B6-Tg/-	B6-/-	45	43	34 (75.6)	167
		B6-Tg/-	B6-/-	46	42	36 (78.3)	194
合計				131	124	102 (77.9)	
8-12P		B6-Tg/-	B6-/-	72	72	71 (98.6)	105
		B6-Tg/-	B6-/-	57	57	51 (89.5)	335
		B6-Tg/-	B6-/-	107	106	95 (88.8)	1021
合計				236	235	217 (91.9)	
hANG	2-5p	B6-Tg/-	B6-/-	120	117	107 (89.2)	76
		B6-Tg/-	B6-/-	120	119	108 (90.0)	76

1): 凍結胚に対する割合

表 3-14 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の融解後の生存性：運動失調症モデル

MBP	初代個体 番号	導入遺伝子 ♂	使用系統と導入遺伝子型 ♀	凍結胚数	回収胚数	形態的正常 胚数 (%) <sup>1)</sup>	保存期間 (日)
	561-7m	B6-Tg/-	B6-/-	40	40	37 (92.5)	28
			B6-Tg/-	32	32	28 (87.5)	157
合計				72	72	65 (90.3)	
	563-1p	B6-Tg/-	B6-/-	30	30	28 (93.3)	30
			B6-Tg/-	60	58	53 (88.3)	152
合計				90	88	81 (90.0)	
	643-7p	B6-Tg/-	B6-/-	43	43	40 (93.0)	36
			B6-Tg/-	38	38	36 (94.7)	42
			B6-Tg/-	40	38	35 (87.5)	1316
			B6-Tg/-	60	59	54 (90.0)	1325
合計				181	178	165 (91.2)	
aMBP	664-8p	B6-Tg/-	B6-/-	60	59	56 (93.3)	86
			B6-Tg/-	60	60	55 (91.7)	105
			B6-Tg/-	40	39	33 (82.5)	597
			B6-Tg/-	35	34	33 (94.3)	861
			B6-Tg/-	35	36	32 (91.4)	868
合計				230	228	209 (90.9)	

表 3-15 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植による発生能: 腫瘍モデル(1)

導入遺伝子 番号	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数(%)	産仔数 (%)	保存期間 (日)	
c-Ha-ras	H-2	B6-Tg/-	30	2/2 (100)	17 (56.7)	8	
		B6-Tg/-	38	2/2 (100)	20 (52.6)	16	
		B6-Tg/-	93	6/6 (100)	61 (65.6)	124	
		B6-Tg/-	155	9/10 (90.0)	76 (48.0)	618	
合計			316		174 (55.1)		
H-7	H-7	B6-Tg/-	97	6/6 (100)	57 (58.8)	77	
		B6-Tg/-	198	10/12 (83.3)	89 (44.9)	78	
		B6-Tg/-	439	23/24 (95.8)	223 (50.8)	112	
		B6-Tg/-	656	35/37 (94.6)	393 (59.9)	205	
合計			1390		762 (54.8)		
H-8	H-8	B6-Tg/-	34	2/3 (66.7)	14 (41.2)	38	
		B6-Tg/-	128	6/8 (75.0)	52 (40.6)	130	
		合計		162		66 (40.7)	
		B6-Tg/-	69	4/4 (100)	38 (55.1)	112	
B6-Tg/-	243	13/14 (92.9)	126 (51.9)	332			
B6-Tg/-	225	9/12 (75.0)	87 (38.7)	339			
合計			537		251 (46.7)		

表 3-16 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植による発生能：腫瘍モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型 ♂	♀	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数(%)	産仔数 (%)	保存期間 (日)
HBV	2-2p	C3H-Tg/-	C3H--/-	77	4/4 (100)	34 (44.2)	2
	3-4p	C3H-Tg/-	C3H--/-	43	2/2 (100)	24 (55.8)	2

表 3-17 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植による発生能：免疫不全症モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂	使用系統と導入遺伝子型	♀	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数(%)	産仔数 (%)	保存期間 (日)
h11-2	524-2m	B6-Tg/-	B6-/-	29	2/2 (100)	17 (58.6)	6	
		B6-Tg/-	B6-/-	28	1/2 (50.0)	10 (35.7)	6	
		B6-Tg/-	B6-/-	117	5/7 (71.4)	46 (39.3)	15	
		B6-Tg/-	B6-/-	38	2/2 (100)	13 (34.2)	16	
		B6-Tg/-	B6-/-	89	5/5 (100)	44 (49.4)	24	
		B6-Tg/-	B6-/-	33	1/2 (50.0)	9 (27.3)	28	
		B6-Tg/-	B6-/-	30	2/2 (100)	16 (53.3)	33	
		B6-Tg/-	B6-/-	71	4/4 (100)	28 (39.4)	53	
		B6-Tg/-	B6-/-	48	3/3 (100)	22 (45.8)	80	
		B6-Tg/-	B6-/-	20	1/1 (100)	8 (40.0)	87	
		B6-Tg/-	B6-/-	53	4/4 (100)	26 (49.1)	96	
		B6-Tg/-	B6-/-	45	3/3 (100)	23 (51.1)	226	
		B6-Tg/-	B6-/-	87	5/5 (100)	38 (43.7)	244	
		B6-Tg/-	B6-/-	67	4/4 (100)	22 (32.8)	328	
		B6-Tg/-	B6-/-	80	3/5 (60.0)	29 (36.3)	522	
		B6-Tg/-	B6-/-	53	3/3 (100)	24 (45.3)	553	

合 計

888

375 (42.2)

表 3-18 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植による発生能：免疫不全モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂	使用系統と導入遺伝子型	♀	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数(%)	産仔数 (%)	保存期間 (日)
hIL-2	692-5m	B6-Tg/-	B6-/-	31	2/2 (100)	16 (51.6)	33	
		B6-Tg/-	B6-/-	36	2/2 (100)	14 (38.9)	116	
合計				67		30 (44.8)		
MThIL-2	661-1m	B6-/-	B6-Tg/-	35	2/2 (100)	17 (48.6)	16	
		B6-/-	B6-Tg/-	21	2/2 (100)	8 (38.1)	58	
		B6-/-	B6-Tg/-	27	1/2 (50.0)	7 (25.9)	88	
		B6-/-	B6-Tg/-	27	2/2 (100)	14 (51.9)	135	
合計				110		46 (41.8)		
702-9m		B6-/-	B6-Tg/-	28	2/2 (100)	15 (53.6)	94	
		B6-/-	B6-Tg/-	25	2/2 (100)	11 (44.0)	94	
		B6-/-	B6-Tg/-	26	2/2 (100)	12 (46.2)	132	
合計				79		38 (48.1)		



表 3-19 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植による発生能：免疫不全症モデル(3)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 導入遺伝子型	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数(%)	産仔数 (%)	保存期間 (日)
TCR	1-11p	B6-Tg/-	B6-/-	31	2/2 (100)	14 (45.2)	33
		B6-Tg/-	B6-/-	36	2/3 (66.7)	12 (33.3)	116
合計				67		26 (38.8)	
TCR	1-17p	B6-Tg/-	B6-/-	38	3/3 (100)	15 (39.5)	28
		B6-Tg/-	B6-/-	32	2/2 (100)	14 (43.8)	420
		B6-Tg/-	B6-/-	28	2/2 (100)	13 (46.4)	454
合計				98		42 (42.9)	

表 3-20 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植による発生能：高血圧症モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数(%)	産仔数 (%)	保存期間 (日)
		♂	♀				
FREN	82-3m	B6-Tg/-	B6-/-	15	1/1 (100)	8 (53.8)	36
		B6-Tg/-	B6-/-	43	2/3 (66.7)	17 (39.5)	56
		B6-Tg/-	B6-/-	35	2/2 (100)	20 (57.1)	413
	合計			93		45 (48.4)	
	84-4m	B6-Tg/-	B6-/-	78	4/5 (80.0)	33 (42.3)	46
		B6-Tg/-	B6-/-	66	4/4 (100)	37 (56.1)	102
		B6-Tg/-	B6-/-	87	4/5 (80.0)	35 (40.2)	361
	合計			231		105 (45.5)	
RANG	64-6m	B6C-Tg/-	B6-/-	20	1/1 (100)	13 (65.0)	66
		B6C-Tg/-	B6-/-	32	2/2 (100)	18 (56.3)	113
		合計		52		31 (59.6)	
108-4m		B6C-Tg/-	B6-/-	55	3/3 (100)	24 (43.6)	52
		B6C-Tg/-	B6-/-	36	2/2 (100)	19 (52.8)	151
		合計		91		43 (47.3)	

表 3-21 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植による発生能: 高血圧症モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂	使用系統と導入遺伝子型	♀	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数(%)	産仔数 (%)	保存期間 (日)
hREN	8-3m	B6-Tg/-	B6-/-	32	1/2 (50.0)	11 (34.4)	105	
		B6-Tg/-	B6-/-	34	2/2 (100)	16 (47.1)	167	
		B6-Tg/-	B6-/-	36	2/2 (100)	15 (41.7)	194	
	合計			102		42 (41.2)		
hANG	8-12P	B6-Tg/-	B6-/-	60	4/4 (100)	36 (60.0)	105	
		B6-Tg/-	B6-/-	51	2/3 (66.7)	19 (37.3)	335	
		B6-Tg/-	B6-/-	95	6/6 (100)	51 (53.7)	1021	
	合計			206		106 (51.5)		
hANG	2-5p	B6-Tg/-	B6-/-	107	6/6 (100)	48 (44.9)	76	
		B6-Tg/-	B6-/-	98	6/6 (100)	49 (50.0)	76	

表 3-22 凍結保存したトランスジェニックマウス2細胞期胚の移植による発生能: 運動失調症モデル

導入遺伝子 番号	初代個体 番号	♂	使用系統と導入遺伝子型	♀	移植胚数	妊娠成立数/ レシビエント数(%)	産仔数 (%)	保存期間 (日)
MBP	561-7m	B6-Tg/-	B6-/-	37	2/2 (100)	14 (37.8)	28	
		B6C-Tg/-	B6-/-	28	2/2 (100)	15 (53.6)	157	
	合計			65		29 (44.6)		
563-1p	563-1p	B6-Tg/-	B6-/-	26	1/2 (50.0)	9 (34.6)	30	
		B6C-Tg/-	B6-/-	53	3/4 (100)	22 (41.5)	152	
	合計			79		31 (38.3)		
	648-7p	648-7p	B6C-Tg/-	B6-/-	40	2/3 (66.7)	13 (32.5)	36
B6C-Tg/-			B6-/-	36	2/2 (100)	24 (66.7)	42	
B6C-Tg/-		B6-/-	35	2/2 (100)	18 (51.4)	1316		
B6C-Tg/-		B6-/-	54	3/4 (75.0)	20 (37.0)	1325		
合計			165		75 (45.5)			
aMBP	664-9p	B6C-Tg/-	B6-/-	56	4/4 (100)	35 (62.5)	86	
		B6C-Tg/-	B6-/-	55	4/4 (100)	31 (56.4)	105	
		B6C-Tg/-	B6C-/-	33	2/2 (100)	24 (72.7)	597	
		B6C-Tg/-	B6C-/-	32	2/2 (100)	14 (43.8)	861	
		B6C-Tg/-	B6C-/-	32	2/2 (100)	20 (62.5)	868	
合計			208		124 (59.6)			

表 3-23 凍結保存胚から得られた仔への導入遺伝子の伝達：腫瘍モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		総数	解析個体		保存期間 (日)
		♂	♀		Tg/-(♀:♂)	-/(♀:♂)	
c-Ha-ras	H-2	B6-Tg/-	B6-/-	15	7 (4:3)	8 (3:5)	8
		B6-Tg/-	B6-/-	18	10 (6:4)	8 (4:4)	16
		B6-Tg/-	B6-/-	58	29 (14:15)	29 (14:15)	124
		B6-Tg/-	B6-/-	71	33 (15:18)	38 (21:17)	618
合計				162	79 (39:40)	83 (42:41)	
		B6-Tg/-	BALB-/-	51	26 (14:12)	25 (14:11)	77
		B6-Tg/-	BALB-/-	81	38 (21:17)	43 (22:21)	78
		B6-Tg/-	BALB-/-	210	111 (55:56)	99 (51:48)	112
		B6-Tg/-	BALB-/-	366	161 (80:81)	205 (98:107)	205
合計				708	336(170:166)	372(185:187)	
H-7		B6-Tg/-	B6-/-	11	4 (3:1)	7 (4:3)	38
		B6-Tg/-	B6-/-	46	22 (12:10)	24 (14:10)	130
合計				57	26 (15:11)	31 (18:13)	
H-8		B6-Tg/-	B6-/-	32	17 (8:9)	15 (8:7)	112
		B6-Tg/-	B6-/-	118	60 (28:32)	58 (25:33)	332
		B6-Tg/-	B6-/-	81	35 (17:18)	46 (25:21)	339
合計				231	112 (53:59)	119 (58:61)	

表 3-24 凍結保存胚から得られた仔への導入遺伝子の伝達：腫瘍モデル(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂ 使用系統と導入遺伝子型	♀ 導入遺伝子型	解析個体		保存期間 (日)
				総数	Tg/-(♀:♂) -/(♀:♂)	
HBV	2-2p	C8H-Tg/-	C3H--/-	34	14 ( 8 : 6 ) 20 ( 6 : 14 )	2
	3-4p	C8H-Tg/-	C3H--/-	24	13 ( 7 : 6 ) 11 ( 4 : 7 )	2

表 3-25 凍結保存胚から得られた仔への導入遺伝子の伝達: 免疫不全症モデル(1)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		♀	総数	解析個体		-/- (♀: ♂)	保存期間 (日)
		♂	♀			Tg/- (♀: ♂)	-/- (♀: ♂)		
h11-2	524-2m	B6-Tg/-	B6-/-	15	6 (1: 5)	9 (4: 5)	6	6	
		B6-Tg/-	B6-/-	8	6 (3: 3)	2 (2: 0)	6	6	
		B6-Tg/-	B6-/-	42	22 (10: 12)	20 (12: 8)	15	15	
		B6-Tg/-	B6-/-	11	6 (4: 2)	5 (2: 3)	16	16	
		B6-Tg/-	B6-/-	42	18 (10: 8)	24 (11: 13)	24	24	
		B6-Tg/-	B6-/-	9	3 (2: 1)	6 (5: 1)	28	28	
		B6-Tg/-	B6-/-	10	1 (1: 0)	9 (5: 4)	33	33	
		B6-Tg/-	B6-/-	27	13 (5: 8)	14 (7: 7)	53	53	
		B6-Tg/-	B6-/-	15	11 (4: 7)	4 (3: 1)	56	56	
		B6-Tg/-	B6-/-	22	13 (6: 7)	9 (5: 4)	80	80	
		B6-Tg/-	B6-/-	8	4 (1: 3)	4 (2: 2)	87	87	
		B6-Tg/-	B6-/-	24	10 (3: 7)	14 (6: 8)	96	96	
		B6-Tg/-	B6-/-	16	9 (5: 4)	7 (5: 2)	226	226	
		B6-Tg/-	B6-/-	88	19 (9: 10)	19 (7: 12)	244	244	
		B6-Tg/-	B6-/-	21	11 (6: 5)	10 (4: 6)	328	328	
		B6-Tg/-	B6-/-	25	14 (6: 8)	11 (6: 5)	522	522	
		B6-Tg/-	B6-/-	22	9 (4: 5)	13 (5: 8)	553	553	
合 計					355	175 (80: 95)	180 (91: 89)		

表 3-26 凍結保存胚から得られた仔への導入遺伝子の伝達：免疫不全症モデル(2)

導入遺伝子 番号	初代個体 番号	♂	使用系統と導入遺伝子型 ♀	解析個体		保存期間 (日)
				総数	Tg/-(♀: ♂)    -/-(♀: ♂)	
hIL-2	692-5m	B6-Tg/-	B6-/-	12	4 (2: 2)	33
		B6-Tg/-	B6-/-	10	6 (4: 2)	116
		合計		22	10 (6: 4)	12 (6: 6)
MThIL-2	661-1m	B6-/-	B6-Tg/-	15	6 (3: 3)	16
		B6-/-	B6-Tg/-	8	3 (2: 1)	58
		B6-/-	B6-Tg/-	6	4 (3: 1)	88
		B6-/-	B6-Tg/-	12	6 (2: 4)	135
		合計		41	19 (10: 9)	22 (12: 10)
702-9m		B6-/-	B6-Tg/-	14	8 (5: 3)	94
		B6-/-	B6-Tg/-	10	5 (2: 3)	94
		B6-/-	B6-Tg/-	9	4 (0: 4)	132
合計		33	17 (7: 10)	16 (7: 9)		



表 3-27 凍結保存胚から得られた仔への導入遺伝子の伝達：免疫不全症モデル(3)

導入遺伝子	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型		解析個体		保存期間 (日)
		♂	♀	Tg/-(♀:♂)	-/(♀:♂)	
TCR	1-11p	B6-Tg/-	B6-/-	4 (1:3)	7 (5:2)	33
		B6-Tg/-	B6-/-	6 (3:3)	5 (3:2)	116
合計				10 (4:6)	12 (8:4)	
1-17p		B6-Tg/-	B6-/-	6 (3:3)	8 (5:3)	28
		B6-Tg/-	B6-/-	5 (1:4)	6 (4:2)	420
合計				5 (2:3)	8 (4:4)	454
合計				16 (6:10)	22 (13:9)	

表 3-28 凍結保存胚から得られた仔への導入遺伝子の伝達: 高血圧症モデル(1)

導入遺伝子 番号	初代個体 番号	使用系統と導入遺伝子型 ♂	♀	解析個体		保存期間 (日)	
				総数	Tg/-(♀:♂) -/(♀:♂)		
rREN	82-3m	B6-Tg/-	B6-/-	8	3 (2: 1)	5 (2: 3)	36
		B6-Tg/-	B6-/-	14	6 (2: 4)	8 (5: 3)	56
		B6-Tg/-	B6-/-	17	8 (4: 4)	9 (5: 4)	413
	合計			39	17 (8: 9)	22 (12:10)	
rANG	84-4m	B6-Tg/-	B6-/-	30	13 (7: 6)	17 (10: 7)	46
		B6-Tg/-	B6-/-	34	18 (7:11)	16 (8: 8)	102
		B6-Tg/-	B6-/-	31	13 (9: 4)	18 (7:11)	361
	合計			95	44 (23:21)	51 (25:26)	
rANG	64-6m	B6C-Tg/-	B6-/-	13	6 (3: 3)	7 (2: 5)	66
		B6C-Tg/-	B6-/-	15	7 (3: 4)	8 (5: 3)	113
		合計		28	13 (6: 7)	15 (7: 8)	
108-4m	108-4m	B6C-Tg/-	B6-/-	22	11 (7: 4)	11 (6: 5)	52
		B6C-Tg/-	B6-/-	18	8 (5: 3)	10 (6: 4)	151
		合計		40	19 (12: 7)	21 (12: 9)	

表 3-29 凍結保存胚から得られた仔への導入遺伝子の伝達：高血圧症モデル症(2)

導入遺伝子	初代個体 番号	♂	使用系統と導入遺伝子型 ♀	総数		解剖個体		保存期間 (日)
				Tg/- (♀: ♂)	-/- (♀: ♂)	Tg/- (♀: ♂)	-/- (♀: ♂)	
hREN	8-8m	B6-Tg/-	B6-/-	10	5 (3: 2)	5 (3: 2)	105	
		B6-Tg/-	B6-/-	13	6 (3: 3)	7 (5: 2)	167	
		B6-Tg/-	B6-/-	15	7 (4: 3)	8 (5: 3)	194	
合計				38	18 (10: 8)	20 (13: 7)		
hRNG	8-12P	B6-Tg/-	B6-/-	32	14 (8: 6)	18 (10: 8)	105	
		B6-Tg/-	B6-/-	19	8 (4: 4)	11 (7: 4)	335	
		B6-Tg/-	B6-/-	48	25 (13: 12)	23 (11: 12)	1021	
合計				99	47 (25: 22)	52 (28: 24)		
hRNG	2-5p	B6-Tg/-	B6-/-	47	22 (10: 12)	25 (14: 11)	76	
		B6-Tg/-	B6-/-	44	20 (11: 9)	24 (13: 11)	76	

表 3-30 凍結保存胚から得られた仔への導入遺伝子の伝達：運動失調症モデル

導入遺伝子 番号	初代個体 使用系統と導入遺伝子型		解析個体		保存期間 (日)	
	♂	♀	総数	Tg/-(♀: ♂) /-(♀: ♂)		
MBP	B6-Tg/-	B6-/-	14	6 (3: 3)	8 (2: 6)	28
	B6C-Tg/-	B6-/-	12	5 (3: 2)	7 (3: 4)	157
合計			26	11 (6: 5)	15 (5: 10)	
563-1p	B6C-Tg/-	B6-/-	9	3 (3: 0)	6 (4: 2)	30
	B6C-Tg/-	B6-/-	22	12 (7: 5)	10 (4: 6)	152
合計			31	15 (10: 5)	16 (8: 8)	
643-7p	B6C-Tg/-	B6-/-	13	6 (4: 2)	7 (5: 2)	36
	B6C-Tg/-	B6-/-	24	6 (3: 3)	18 (8: 10)	42
643-7p	B6C-Tg/-	B6-/-	16	7 (4: 3)	9 (3: 6)	1316
	B6C-Tg/-	B6-/-	19	12 (7: 5)	7 (3: 4)	1325
合計			72	31 (18: 13)	41 (19: 22)	
aMBP	B6C-Tg/-	B6-/-	35	10 (6: 4)	25 (11: 14)	86
	B6C-Tg/-	B6-/-	31	13 (7: 6)	18 (10: 8)	105
664-9p	B6C-Tg/-	B6-/-	21	10 (6: 4)	11 (6: 5)	597
	B6C-Tg/-	B6-/-	14	6 (4: 2)	8 (1: 7)	861
合計			20	7 (3: 4)	13 (6: 7)	868
合計			121	46 (26: 20)	75 (34: 41)	

表 3-31 疾患モデルとして利用される各種ミュータント系マウス2細胞期胚の凍結保存成績

疾患モデルと しての分類	系 統	凍結胚数	回収胚数	形態的正常 胚数 (%) <sup>1)</sup>
筋ジストロフィー症	C57BL/6-dy/dy	607	585	497 (81.9)
"	C57BL/10-mdx/mdx	130	127	121 (93.1)
肥満症	C57BL/6-ob/ob	60	60	53 (88.3)
運動失調症	BALB/c-fl/fl	80	77	70 (87.5)
"	BALB/c-shi/shi	120	116	110 (91.7)
"	C57BL/6-shi/shi	244	239	231 (94.7)
"	C57BL/6-mld/mld	132	128	124 (93.9)
免疫不全症	BALB/c-nu/nu	120	116	106 (88.3)
"	CBA-nu/nu	60	60	56 (93.3)
"	C57BL/6-nu/nu	80	80	60 (75.0)
"	CB-17-scid/scid	120	116	112 (93.3)
自己免疫疾患	MRL/MpJ-lpr/lpr	143	138	130 (90.9)
糖尿病	KK	120	117	98 (81.7)
"	NOD	80	76	71 (88.8)

1): 凍結胚に対する割合

表 3-32 体外受精に由来する各種マウス系マウス2細胞期胚の移植成績

系 統	移植胚数	妊娠成立数/ レシピアエント数(%)	産仔数 (%) <sup>1)</sup>	離乳仔	
				総数 (%) <sup>2)</sup>	(♀:♂)
C57BL/6-dy/dy	444	23/28 (82.1)	156 (35.1)	104 (66.7)	(51:53)
C57BL/10-mdx/mdx	117	6/8 (75.0)	59 (50.4)	46 (78.0)	(22:24)
C57BL/6-ob/ob	48	3/3 (100)	26 (54.2)	16 (61.5)	(7:9)
BALB/c-r1/r1	70	4/5 (80.0)	27 (38.6)	25 (92.6)	(14:11)
BALB/c-shi/shi	110	6/7 (85.7)	48 (43.6)	44 (91.7)	(21:23)
C57BL/6-shi/shi	216	12/14 (85.7)	114 (52.8)	97 (85.1)	(38:58)
C57BL/6-mid/mld	124	8/8 (100)	69 (55.6)	66 (95.7)	(37:29)
BALB/c-nu/nu	106	6/7 (85.7)	46 (43.4)	27 (58.7)	(10:17)
CBA-nu/nu	54	4/4 (100)	27 (50.0)	15 (55.6)	(7:8)
C57BL/6-nu/nu	60	4/4 (100)	21 (35.0)	8 (38.1)	(5:3)
CB-17-scid/scid	112	5/7 (71.4)	43 (38.4)	32 (74.4)	(14:18)
MRL/MpJ-lpr/lpr	128	6/8 (75.0)	52 (40.6)	46 (88.5)	(20:26)
KK	90	6/6 (100)	43 (47.8)	36 (83.7)	(19:17)
NOD	71	5/5 (100)	37 (52.1)	34 (91.9)	(16:18)

1): 移植胚に対する割合 2): 産仔数に対する割合

表 3-33 体外受精由来の各種系統マウス2細胞期胚の緩慢凍結・緩慢融解による凍結保存成績

系 統	凍結胚数	形態的正常胚数 (%) <sup>1)</sup>	移植胚数	産仔数 (%) <sup>2)</sup>
AKR	80	51 (85.0)	51	9 (17.6)
BALB/c	289	273 (94.5)	254	105 (41.3)
CBA	90	86 (95.6)	86	47 (54.7)
C3H/He	199	186 (93.5)	144	84 (58.3)
C57BL/6	280	259 (92.5)	195	108 (55.4)
C57BL/10	342	316 (92.4)	302	159 (52.6)
DBA/2	450	394 (87.6)	320	49 (15.3)
DDK	90	80 (88.9)	80	41 (51.3)
SWV	105	96 (91.4)	90	49 (54.4)
BCF1	140	137 (97.9)	130	81 (62.3)
BDF1	180	165 (91.7)	152	93 (61.2)
B6C3F1	120	116 (96.7)	112	70 (62.5)
CR6F1	120	113 (94.2)	97	58 (59.8)
MCH:ICR	120	111 (92.5)	108	60 (55.6)
ICR	120	108 (90.0)	108	56 (51.9)

1): 凍結胚に対する割合 2): 移植胚に対する割合

## 総合論議

ヒトを含めた各種の動物の疾患を解明し、その治療法と予防法を開発する研究を行う上で、モデル動物が重要な役割を担っている。このような疾患モデル動物には、実験的発症モデルと自然発症モデルとがある。実験的発症モデルは正常な個体に処置を施して研究目的に合うように改変したものであり、また、自然発症モデルは個々の動物が持つ遺伝的な要因で異常を起こすものである。1960年代に米国において、ヒトにみられる各種の疾患が他の動物種でもみられることが示されてから (Cornelius and Arias, 1963; Orkin, 1967; Leader and Leader, 1971)、実験動物や野生動物の中から研究目的にあったモデル動物を探す動きが活発になされてきた (National Academy of Sciences, 1968, 1969, 1970.



1971)。この方式で、これまでに多数の疾患モデル動物が開発されており（川俣・松下，1979，1982；富田ら，1983；京極，1984）、現在においても積極的な活動が続いている。

しかし最近は、より積極的なモデル動物の作出が行われるようになってきた。とくにマウスでは、トランスジェニックやキメラの技術により、ヒト疾患に関連するヒトの遺伝子を持つ疾患モデル動物の作出が可能となっている（Jaenisch，1988；Tybulewicz et al.，1992；Fukamizu et al.，1993）。このような外から導入されたヒト遺伝子によって発症するモデル動物の疾患は、よりヒト疾患に近いと考えられる。

新しい疾患モデル動物の開発につながるトランスジェニックやキメラを作出する発生工学の実験を行うには、まず材料となる受精卵や初期胚が必要である、しかしながら、発生段階の揃った受精卵や胚を、実験に必要とする十分な数だけ得るのは、困難なことである。

マウスでは、性腺刺激ホルモン（主にPMSGとhCG）の処理により容易に排卵を誘起できることから、一般的な方法として広く利用されている（Gates, 1971; Biggers et al., 1971）。しかし、系統や日齢、投与するホルモン量などで差があることや、その後の交配成績にも大きな系統差のあることも知られている（Mobraaten, 1981; 横山・長谷川, 1989; 横山・日置, 1990; 伊田ら, 1991; 鈴木ら, 1991）。排卵が誘起できても交尾しないものについては、体外受精の方法によって、効率的に受精卵を作製することができる（横山ら, 1988; 横山・長谷川, 1991）。しかし、体外受精成績にも系統差のあることが報告されていることから（Iwamatu and Chang, 1971; Kasai et al., 1978）、実験を開始するにあたっては、個々の系統に適合する条件を調べておくことが重要と考えられる。しかしながら、一部の系統を除いては、体外受精法で発生段階の揃った受精卵や胚を、同時に多数準

備できることから、高い実用的な価値を持っている(豊田, 1988; 横山ら, 1988)。

また、本研究で示されたように、繁殖障害を伴う系統でも、正常な卵子と精子を採取することができれば、体外受精して受精卵を作製し、これをレシピエント雌に移植して産仔を得ることが可能である(Yokoyama et al., in press)。ミュータント系で常染色体劣性遺伝のホモ型で発症して不妊となる系統では、ミュータント遺伝子をヘテロ型で持つ個体間で交配して産仔を得るのが従来の方法である。この場合、ヘテロ型の個体は、あらかじめ後代検定によって選抜する必要があることから、それに費やされる労力や経費、時間は大きな負担である。また、ヘテロ型の個体間の交配で得られる産仔は、ホモ型・ヘテロ型・正常の各個体が混じっているので、発症前の判定は困難な場合が多い。ホモ型の個体の雄と雌の間で体外受精できれば、以上の問題点が解決され、疾患発症前のホモ型個体を使用する

研究等に大きな貢献が期待できる。

さらに、本研究では、幼若雌個体を用いた体外受精と胚移植で、トランスジェニックマウスの遺伝的背景を短期間で変換可能なことを明らかにした(Yokoyama et al., in press)。ミュータント系やトランスジェニック系では、その遺伝的背景の重要性が指摘されており(近藤, 1983)、短期間で目的とする系統の遺伝的背景に変換することに、この手法の有効利用が期待される。

一方、これまでに開発された多くの疾患モデル系や、つぎつぎと新たに作出されるモデル系統の遺伝子保存のためには、胚や配偶子での凍結保存が不可欠である。マウスでは、各種の系統で胚の凍結保存が検討されており(Glenister and Lyon., 1981; Mobraaten, 1981; Yokoyama et al., 1981; Yoshiki et al., 1987; 横山, 1985; 横山・中潟, 1991)、これまで困難であった精子の凍結保存も実用的な方法として確立されつつある(奥山ら,

1990；横山ら，1990；Tada et al., 1990；横山・中潟，1991）。

本研究で検討を行った生殖工学を基盤とした排卵誘起、体外受精、胚および精子の凍結保存技術を利用することにより、実験動物の発生をコントロールでき、材料としての胚や動物個体を必要とする数だけ、計画的に作出できることが示された。このような実験システムは、今後の疾患モデル動物の開発と改良の研究に、大きく貢献することが期待される。

## 総 括

疾患モデル動物は、ヒトを含めた各種動物の疾患を解明し、治療法や予防法を開発する研究のために重要な役割を果たしている。これらの疾患モデル動物の開発は、主に偶然の機会に発見された突然変異個体から育成する方法で行われてきたが、近年はこれに加えて、胚に対する種々の操作を施す発生工学の手法によって、研究の目的に合ったモデル動物を作出することが可能となってきた。とくにマウスでは、トランスジェニックやキメラの技術を用いて、ヒト疾患と発生機序が同一な遺伝子サイドに立つ、新たな疾患モデル動物がつつぎと作出されている。これらの研究を行ううえでは、材料となる胚を効率的に採取したり、種々の操作を施した胚から効率的に個体を得る条件の他に、作出された繁殖能力

の弱い個体を系統化して疾患モデル動物を育成したり、系統保存を行うための基礎的な諸条件を明らかにしておく必要がある。本研究は、排卵誘起、体外受精、胚移植、精子および胚の凍結保存等の生殖工学的技術により、各種の疾患モデルマウスの作出と系統化、ならびに系統保存に関する諸条件を明らかにすることを目的に行われた。

第1章では、誘起排卵と胚の採取に関する基礎的条件を検討した。その結果、性腺刺激ホルモン(PMSG-hCG)の処理による反応性には系統により差がみられた。自然排卵数に対する誘起排卵数の増加率は1.7~4.8倍で、実験に供した12系統とも効率的に過排卵を誘起できることが示された。しかし、PMSG-hCG処理した24系統の雌の交尾成立率は16~84%の範囲で系統によって差が大きく、その中の12系統は50%以下の値であった。また、交尾した雌から採取された正常胚(8~16細胞期)数にも系統差があり、11系統では11~31個と自

然排卵数と同等かそれ以上の値なのに対して、他の13系統は10個以下の低い値であった。したがって、PMSG-hCG処理により効率的に排卵は誘起できるものの、半数の系統では交尾成立率に変動が大きく、採取できる正常胚数の予測は困難であることが示唆された。

他方、成熟雌から得た誘起排卵された卵子と、成熟雄の精巢上体尾部精子を用いた体外受精では、5系統の近交系の系統内および系統間のいずれの組み合わせにおいても高い受精率が得られ、自然交配による体内受精率に比較して受精成績に変動の少ないことが明らかとなった。

第2章では、第1章の成果を踏まえ、著者が作出した10種類の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて体外受精を実施した。このうちの8種類のトランスジェニックマウスでは70%以上の受精率が得られ、移植胚の30~90%が産仔へ発生した。しかし、マウスのメタロチオネイン-I遺伝子をプロ



モーターとして用いた2種類の遺伝子を導入した雄個体で精子形成に異常が生じた。すなわち、ヒト・インターロイキン2遺伝子を導入した雄個体からは精子が得られず、ラット・レニン遺伝子を導入した個体から採取した精子の受精率は30%以下と低い値であった。また、導入遺伝子の機能発現のために運動失調を呈し、従来の自然交配によっては産仔が得られない個体も出現したが、体外受精と胚移植で産仔を作出して継代維持できることが示された。さらに、幼若トランスジェニック雌に誘起排卵し、体外受精と胚移植で産仔を得て世代を継ぐ実験を第8代目まで繰り返すことによって、その遺伝的背景を他系統に変換することが、従来の交配による方法よりも短期間で行えることが知られた。

一方、自然発症モデルとして使用されるミュータント系マウスは、その特性ゆえに繁殖能力が低いものが多いが、これらの系統に対しても体外受精と胚移植の有効性が示された。

すなわち、常染色体劣性遺伝のホモ型で疾患を発症して不妊となる個体から、それぞれ卵子と精子を採取し、体外受精することによって、ホモ個体間の交配が可能となった。従来は、ミュータント遺伝子をヘテロ型で持つ個体同士の交配で産仔を得ており、この場合にはホモ個体と正常個体が同腹仔として生まれるために、疾患発症時までそれぞれの個体を判別できなかった。しかし、体外受精では明確にミュータント遺伝子をホモ型で持つ産仔を作出できることから、これまで不可能であった疾患発症前の個体を使用する新たな実験も可能となることが示された。

第3章では、疾患モデル系統の遺伝資源の保存を目的として、精子の凍結保存法を開発した。精巣上体尾部から採取した精子を10%ラフィノース+5%グリセリンを含む保存液に懸濁して凍結し、融解後に体外受精を行い、この受精卵を移植することにより高い値で産仔の得られることが示された。マウス精子の

凍結保存は、これまで困難を極めてきたが、この成果を基に方法が確立され、実用化の目処がついた。

さらに、前述の体外受精によって作出された胚を2細胞期で、緩慢法によって凍結した。トランスジェニック系およびミュータント系とも、胚の融解後の生存性は75%以上と高く、移植によって20~77%が産仔として得られた。なお、保存期間は2~1325日に及んだが、期間の延長に伴う胚の生存性の低下や各個体の遺伝形質の変化等に及ぼす影響は認められず、遺伝子保存が確実にできることが示唆された。

以上のように、生殖工学的な技術を機能的に組み合わせる新しい実験系の普及は、疾患モデル動物の開発にだけでなく、今後の動物実験や動物生産体制にもおおきな改良をもたらすことが考えられる。

## 謝 辞

本研究をまとめるにあたり、多大なご指導  
とご援助を賜りました東京大学医科学研究所  
獣医学研究部・豊田 裕教授にこころから感  
謝いたします。また、本研究を行う機会を与  
えていただきました(財)実験動物中央研究  
所所長・野村達次博士および九州大学生体防  
御医学研究所細胞学部門・勝木元也教授に深  
謝いたします。

本研究の遂行にあたり、(財)実験動物中  
央研究所・発生工学研究室、生殖研究室なら  
びに(株)ディナードの皆様にはさまざま  
ご支援をいただきました。また、共同研究を  
していただきました多数の皆様にも多大なご  
支援を賜りました。併せてここに深くお礼を  
申しあげます。

引用文献

- Arahata, K., Y. Hayashi, R. Koga, K. Goto, J. H. Lee, Y. Miyagoe, H. Ishii, T. Tsukahara, S. Takeda, M. Woo, I. Nonaka, T. Matsuzaki and H. Sugita : Laminin in animal models for muscular dystrophy; Detect of Laminin M in skeletal and cardiac muscles and peripheral nerve of homozygous dystrophic dy/dy mice. Proc. Jap. Acad., 69-B: 259-264, 1993.
- Biggers, J. D., W. K. Whitten and D. G. Wittingham : The culture of mouse embryos *in vitro*. In: Methods in mammalian embryology. (ed. by J. C. Daniel, Jr.). pp. 86-116, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1971.
- Bonneville, M., I. Ishida, P. Mombaerts, M. Katsuki, S. Verbeek, A. Berns and S. Tonegawa : Blokage of  $\alpha\beta$  T-cell development by TCR  $\gamma\delta$  transgenes. Nature, 342: 931-934, 1989.
- Brinster, R. L., H. Y. Chen, M. E. Trumbauer and M. K. Yagle : Factor affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4438-4442, 1985.
- Capecchi, M. R., : Altering the genome by homologous recombination. Science, 244: 1288-1292, 1989.
- Champlin, A. K., D. L. Dorr and A. H. Gates : Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. Biol. Reprod., 8: 491-494, 1973.
- Chapman, V. M., D. R. Miller, D. Armstrong and C. T. Caskey : Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1292-1296, 1989.
- Cornelius, C. E. and I. M. Arias : Biomedical models in veterinary medicine. Amer. J. Med., 40: 165-169, 1966.

江崎考三郎・横山峯介：体外受精による筋ジストロフィー（C57BL/6-dy/dy）マウスの作出。厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究」野村班，昭和59年度報告書，pp. 25-29, 1985.

Fukamizu, A., S. S. Min, T. Hatae, M. Yokoyama, T. Nomura, M. Katsuki and K. Murakami : Tissue-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 826-832, 1989.

Fukamizu, A., T. Hatae, M. Sugimura, T. Hasegawa, M. Yokoyama, T. Nomura, M. Katsuki and K. Murakami : Human renin in transgenic mouse kidney is localized to juxtaglomerular cells. *Biochem. J.*, 278: 601-603, 1991.

Fukamizu, A., M. Sugimura, E. Takimoto, F. Sugiyama, M. S. Seo, S. Takahashi, T. Hatae, N. Kajiwarra, K. Yagami and K. Murakami : Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J. Biol. Chem.*, 268: 11617-11621, 1993.

Gates, A. H. : Maximizing yield and developmental uniformity of eggs.  
In: *Methods in mammalian embryology.* (ed. by J. C. Daniel, Jr.), pp. 64-75.  
W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1971.

Glenister, P. H. and M. F. Lyon : Experience of banking mutant genes.  
In: *Frozen storage of laboratory animals.* (ed. by G. H. Zeilmaker),  
pp. 113-117, Gustav Fischer, Stuttgart, 1981.

Gordon, W. J., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa and F. H. Ruddle :  
Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 7380-7384, 1980.

Hino, O., K. Nomura, K. Ohtake, T. Kitagawa, H. Sugano, S. Kimura, M. Yokoyama and M. Katsuki : Rearrangement of integrated HBV DNA in descendants of transgenic mice. *Proc. Jap. Acad.*, 62-B: 355-358, 1986.

Horgan, B., F. Costantini and E. Lacy : Manipulating the mouse embryo.  
*A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1986.

猪 貴義・吉川早紀男・保谷 毅・佐久間勇次：マウスの系統間における排卵数と産仔数との関係。実験動物, 18: 47-51, 1969.

Inoue, Y., K. Mikoshiba, M. Yokoyama, K. Inoue, T. Terashima, T. Nomura and Y. Tsukada : Alteration of the primary pattern of central myelin in a chimaeric enviromeny-study of shiverer $\leftrightarrow$ wild type chimaeras. Develop. Brain Res., 26: 239-247, 1986.

石島芳郎・穴吹一宏・遠藤 克・猪 貴義・佐久間勇次：反復過排卵処理に対するマウスの排卵反応の系統差。日不妊会誌, 23: 59-63, 1978.

Isola, L. M. and G. A. Gordon : Transgenic animals: A new erain developmental biology and medicine. In: Transgenic animals, (eds. by First, N. and F. P. Haseltine), pp. 3-20. Butterworth-Heinemann, madison, 1991.

伊藤雅夫・樋口勝啓・佐久間勇次・猪 貴義：過排卵処置マウスにおける排卵数と着床数の関係。家畜繁殖誌, 19: 153-159, 1974.

Ito, M., K. Hioki, M. Yokoyama and T. Nomura : Preservation of an inbred mouse strain by the storage of frozen embryos: An estimate of the time of occurrence of aserum IgG1 deficiency mutation found in MRL- *lpr*. Lab. Anim. Sci., 42: 211-213, 1992.

Iwamatsu, T. and M. C. Chang : Factors involved in the fertilization of mouse eggs *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 26: 197-208, 1971.

Jaenisch, R. : Transgenic animals. Science, 240: 1468-1474, 1988.

新田一宏・横山峯介・勝木元也：幼若マウスの排卵誘起と誘起卵の発生能について日本実験動物学会第38回総会講演要旨集, pp. 82, 1991.

Kasai, K., Y. Minto and Y. Toyoda : Fertilization and development *in vitro* of mouse eggs from inbred strains and F1 hybrids. Jap. J. Anim. Reprod., 24: 19-22, 1978.

勝木元也・横山峯介：哺乳類（マウス）胚を用いた発生学実験法。実験生物学講座

11. 発生生物学(金谷晴夫, 山上健次郎編), pp. 243-266, 丸善, 東京, 1985.

勝木元也・横山峯介・木村資亜利・小林喜美男・木村 稔・佐藤正宏: 発生工学実験マニュアルトランスジェニック・マウスの作り方. 野村達次(監修); 勝木元也(編), 講談社サイエンティフィック, 東京, 1987.

Katsuki, M., M. Sato, M. Kimura, M. Yokoyama, K. Kobayashi and T. Nomura : Conversion of normal behavior to shiverer by myelin basic protein anti-sense cDNA in transgenic mice. *Science*, 241: 593-595, 1988.

Katsuki, M., M. Kimura, M. Ohta, H. Otani, O. Tanaka, T. Yamamoto, S. Nozawa-Kimura, M. Yokoyama, T. Nomura and S. Habu : Lymphocyte infiltration into cerebellum in transgenic mice carrying human IL-2 gene. *Int. Immunol.*, 1: 214-218, 1989.

Katsuki, M., M. Kimura, J. Hata, R. Takahashi, S. Nozawa-Kimura, M. Yokoyama, M. Izawa, T. Sekiya, S. Nishimura and T. Nomura : Embryonal tumors form transgenic mouse zygotes carrying activated c-Ha-ras genes. *Mol. Biol. Med.*, 6: 567-572, 1989.

Katsuki, M., K. Ando, A. Saitoh, S. Doi, M. Kimura, R. Takahashi, T. Hasegawa, M. Yokoyama, T. Nomura, M. Izawa and S. Nishimura : Chemically induced tumors in transgenic mice carrying prototype human c-Ha-ras genes. In: *Multistage Carcinogenesis*, (eds. by Harris, et al.), pp. 249-257, CRC Press, Tokyo, 1992.

Kaufman, M. H. and D. G. Whittingham : Viability of mouse oocytes ovulated within 14 hours of an injection of pregnant mare's serum gonadotrophin. *J. Reprod. Fertil.*, 28: 465-468, 1972.

川俣順一: 医学のモデルとしての実験動物の開発と問題点. *学術月報*, 29: 15-27, 1976.

川俣順一・松下 宏 編: 疾患モデル動物ハンドブック. 医歯薬出版, 東京, 1979.



川俣順一・松下 宏 編：疾患モデル動物ハンドブック No. 2. 医歯薬出版，  
東京，1982.

Kimura, M., S. Sato, A. Akatsuka, S. Nozawa-Kimura, R. Takahashi, M. Yokoyama,  
T. Nomura and M. Katsuki : Restoration of myelin formation by a single type  
of myelin basic protein in transgenic shiverer mice. Proc. Natl. Acad. Sic.  
USA, 86: 5661-5665, 1989.

Kohno, K., S. Azuma and Y. Toyoda : Loss of fertilizability of cumulus-free  
mouse oocytes upon exposure to DMSO and its prevention by fetal calf  
serum. J. Mamm. Ova. Res., 6: 156-161, 1989.

近藤恭司：実験動物の遺伝的背景，実験動物の遺伝的コントロール，（近藤恭司  
監修：富田 武・江崎孝三郎・早川純一郎編），pp. 2-8, ソフトサイエンス社，  
東京，1983.

近藤恭司：疾患モデル動物開発の遺伝育種学的アプローチ，難病のモデルと動物実  
験，（京極方久編），pp. 28-43, ソフトサイエンス社，東京，1984.

京極方久編：難病のモデルと動物実験—ヒト疾患との共通理解のために，ソフトサ  
イエンス社，東京，1984.

Leader, R. W. and I. Leader : Dictionary of comparative pathology and  
experimental biology. W. B. Saunders, Philadelphia, 1971.

Leibo, S. P. and P. Mazur : Methods for the preservation of mammalian embryos  
by freezing. In: Methods in mammalian reproduction, (ed. by J. C. Daniel, Jr.)  
pp. 179-201, Academic Press, New York, 1978.

Lyon, M. F., P. H. Glenister and D. G. Whittingham : Long-term viability of  
embryos stored under irradiation. In: Frozen storage of laboratory animals  
(ed. by G. H. Zeilmaker), pp. 139-147, Gustav Fischer, Stuttgart, 1981.

Mansour, S. L., K. R. Thomas and M. R. Capecchi : Disruption of the proto-onco-  
gene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells : A general strategy for  
targeting mutations to non-selectable genes. Nature, 336: 348-352, 1988.

御子榮克彦：運動失調モデル（マウス、ラット）。難病のモデルと動物実験。  
（京極方久編），pp. 79-102. ソフトサイエンス社，東京，1984.

Mikoshiba, K., M. Yokoyama, Y. Inoue, K. Takamatsu, Y. Tsukada and T. Nomura :  
Oligodendrocyte abnormalities in shiverer mouse mutant are determined in  
primary chimaeras. *Nature*, 299: 357-359, 1982a.

Mikoshiba, K., M. Yokoyama, K. Takamatsu, Y. Tsukada and T. Nomura : Chimeric  
analysis of the pathogenesis of dysmyelination of shiverer mutant mice :  
Presence of patches of MBP-positive and negative sites in white matter  
indicating the absence of humoral factors for dysmyelination.  
*Dev. Neurosci.*, 5: 520-524, 1982b.

Mobbraaten, L. E. : The Jackson laboratory genetics stocks resource repository  
In: *Frozen storage of laboratory animals*, (ed. by G. H. Zeilmaker),  
pp. 165-177. Gustav Fischer, Stuttgart, 1981.

守田光代・丹羽皓二・入谷 明：マウス体外受精卵の初期発生速度に関する系統間  
比較。日本畜産学会第66回大会講演要旨集，pp. 58, 1977.

Mühlboock, O., (ed.) : *Proceedings of the workshop on basic aspects of  
freeze preservation of mouse strains*. Gustav Fischer, Stuttgart, 1976.

Nakagata, N. : High survival rate of unfertilized mouse oocytes after  
vitrification. *J. Reprod. Fertil.*, 87: 479-483, 1989.

永瀬 弘：牛精子に対する炭水化物の凍害防止効果。凍結・乾燥と細胞障害，  
（根井外喜男編），pp. 83-103. 東京大学出版会，東京，1970.

National Academy of Sciences: *Animal Models for Biomedical Research I*.  
1968.

National Academy of Sciences: *Animal Models for Biomedical Research II*.  
1969.

National Academy of Sciences: *Animal Models for Biomedical Research III*.

1970.

National Academy of Sciences: Animal Models for Biomedical Research IV.  
1971.

Nomura, T., M. Katsuki, M. Yokoyama and Y. Tajima : Future perspectives in the development of new animal models. In: Animal models: Assessing the scope of their use in biomedical research. (eds. by J. Kawamata and E. C. Melby, Jr.), pp. 337-353. Alan R. Liss, Inc., New York, 1987.

楚中征哉・禹 満・横山峯介・江崎考三郎: 筋ジストロフィー筋の発育分化と壊死に関する組織学的、組織化学的研究。厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究」野村班, 昭和60年度報告書, pp. 11-31, 1986.

楚中征哉・禹 満・横山峯介・江崎考三郎: 筋ジストロフィー (mdx, dy) マウス骨格筋における血管変化。厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究」野村班, 昭和61年度報告書, pp. 7-14, 1987.

Ohkubo, H., H. Kawakami, Y. Kakei, T. Takumi, H. Arai, Y. Yokota, M. Imai, Y. Tanabe, M. Masu, J. Hata, H. Iwao, H. Okamoto, M. Yokokama, T. Nomura, M. Katsuki and M. Nakanishi : Generation of transgenic mice with elevated blood pressure by introduction of the rat renin and angiotensinogen genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5153-5157, 1990.

奥山 学・磯貝滋樹・佐賀正彦・浜田 宏・尾川昭三: マウス凍結精子の体外受精及び人工授精試験。日本受精着床学誌, 7: 116-119, 1990.

Orkin, M., : Animal models (spontaneous) for human disease. Arch. Dermat., 95: 524-531, 1967.

Parkening, T. H. and M. C. Chang : Strain differences in the *in vitro* fertilizing capacity of mouse spermatozoa as tested in various media. Biol. Reprod., 15: 647-653, 1976.

Pinkert, C. A. : Transgenic animal technology: A laboratory handbook.

Academic Press, San Diego, 1994.

Russell, W. L., E. M. Kelly, P. R. Hunsicker, J. W. Bangham, S. C. Maddux and E. I. Phipps : Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5918-5919, 1979.

Saitoh, A., M. Kimura, R. Takahashi, M. Yokoyama, T. Nomura, M. Izawa, T. Sekiya, S. Nishimura and M. Katsuki : Most tumors in transgenic mice with human *c-Ha-ras* gene contained somatically activated transgenes. *Oncogene*, 5: 1195-1200, 1990.

佐久間勇次・石島芳郎 : 哺乳動物の卵子(7), 畜産の研究, 29: 81-87, 1975.

Seo, M. S., A. Fukamizu, T. Nomura, M. Yokoyama, M. Katsuki and K. Murakami : The human renin gene in transgenic mice. *J. Cardiovascular Pharmacol.*, 16: S8-S10, 1990.

Sugiyama, F., N. Kajiwara, S. Hayashi, Y. Sugiyama and K. Yagami : Development of mouse oocytes superovulated at different ages. *Lab. Animal. Sci.*, 36: 297-298, 1992.

鈴木 治・浅野敏彦・高野 薫・小浦美奈子・田中利夫 : マウス初期胚の体外発生の系統差について, 家畜生化研報, 27: 7-12, 1991.

鈴木宏志・新谷参郎・富樫 守・宮井達也・岡本道生 : 肥満性糖尿病(db/db) マウスの体外受精と産子への発生成能, 家畜繁殖誌, 33: 96-100, 1987.

鈴木 操 : *c-myc* 遺伝子異常発現の雄性生殖細胞増殖分化に及ぼす影響, 日本疾患モデル学会記録, 10: 53, 1994.

Takahashi, S., A. Fukamizu, T. Hasegawa, M. Yokoyama, T. Nomura, M. Katsuki and K. Murakami : Expression of the human angiotensinogen gene in transgenic mice and transfected cells. *Biochem. Biophys. Commun.*, 180: 1103-1109, 1991.

竹島 勉・田内清憲・五十嵐章之・今道友則・尾川昭三 : マウス精子の凍結保存,

日本実験動物学会第17回講演要旨, pp.72, 1982.

竹島 勉・豊田 裕: マウスの人工授精、とくに受胎率および産仔数におよぼす注入精子数の影響について, 実験動物, 26: 317-322, 1977.

Tanioka, Y., M. Tsukada and K. Esaki: A technique of ovarian transplantation in mice. Exp. Anim., 22: 15-20, 1973.

Terashima, T., K. Inoue, Y. Inoue, M. Yokoyama and K. Mikoshiba: Observation on the cerebellum of normal-reeler mutant mouse chimera. J. Comp. Neurol., 25: 264-278, 1986.

Tada, N., N. Sato, Y. Yamamoto, T. Mizorogi, K. Kasai and S. Ogawa: Cryopreservation of mouse spermatozoa in presence raffinose and glycerol. J. Reprod. Fertil., 89: 511-516, 1990.

田嶋嘉雄編: 実験動物の開発, 医歯薬出版, 東京, 1978.

富田 武・江崎孝三郎・早川純一郎編: 実験動物の遺伝的コントロール, ソフトサイエンス社, 東京, 1983.

豊田 裕・横山峯介・星 冬四郎: マウス卵子の体外受精に関する研究 I. 精巣上体精子による受精成績, 家畜繁殖誌, 16: 147-151, 1971a.

豊田 裕・横山峯介・星 冬四郎: マウス卵子の体外受精に関する研究 II. 精子侵入時期に及ぼす精子体外培養の効果, 家畜繁殖誌, 16: 152-157, 1971b.

豊田 裕: 哺乳動物における試験官内受精, 代謝臨時増刊号性 I, 361-369, 1979.

豊田 裕: 実験動物における発生工学の進歩, 岡山実験動物研究会報, 6: 12-17, 1988.

豊田 裕: マウス卵の過剰排卵, 採卵, 培養, 移植, 臨床科学, 26: 1597-1602, 1990.

- Tybulewicz, V. L. J., M. L. Tremblay, M. E. LaMarca, R. Willemsen, B. K. Stubblefield, S. Winfield, B. Zablocka, E. Sideansky, B. M. Martin, S. P. Huang, K. A. Mintzer, H. Westphal, R. C. Mulligan and E. I. Ginns : Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase genes. *Nature*, 357: 407-410, 1992.
- Wassarman, P. M. and M. L. DePamphilis (eds.) : *Methods in Enzymology. Guid to techniques in mouse development.* Academic Press, San Diego, 1993.
- Whitten, W. K. : Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. *Advan. Biosci.*, 6: 129-141, 1971.
- Whitten, W. K. and C. P. Dagg : Influence of spermatozoa on the cleavage rate of mouse eggs. *J. Exp. Zool.*, 148: 173-183, 1961.
- Whittingham, D. G. : Embryo banks in the future of developmental genetics. *Genetics, Suppl.*, 78: 395-402, 1974.
- Whittingham, D. G. : Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. *J. Reprod. Fertil.*, 49: 89-94, 1977.
- Whittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur : Survival of mouse embryos frozen to -196 °C and -269 °C. *Science*, 178: 411-414, 1972.
- Wilson, E. D. and M. X. Zarrow : Comparison of superovulation in the immature mouse and rat. *J. Reprod. Fertil.*, 3: 148-158, 1961.
- Wilmut, I. : The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on the survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sciences*, 11: 1071-1079, 1972.
- Yamamura, K., Z. Ogita and C. L. Markert : The use of chimeric rats in the analysis of the hooded pigmentation pattern. In: *Genetic approaches to developmental neurobiology* (ed. by Y. Tsukada) pp. 111-128. Univ. of Tokyo press, Tokyo, 1982.

Yokoyama, M., N. Wakasugi and T. Nomura : An attempt to store inbred mouse strains. : Frozen storage of laboratory animals (ed. by G. H. Zeilmaker), pp. 113-117, Gustav Fischer, Stuttgart, 1981.

横山峯介 : 疾患モデル動物作出・維持の新技術—発生工学的技術ならびに体外受精・胚の凍結保存技術を中心にして—, 疾患モデルハンドブック No. 2 (川俣順一・松下 宏編), pp. 557-573, 医歯薬出版, 東京, 1982.

横山峯介 : 動物胚および卵子の凍結保存—実験動物の卵子・胚の凍結保存による系統保存(胚バンク); 動物胚の凍結保存—マウス, 凍結保存—動物・植物・微生物—(酒井 昭編), pp. 97-102, 128-130, 朝倉書店, 東京, 1985.

横山峯介・小島博子 : 体外受精による筋ジストロフィー(C57BL/6-dy/dy) マウス受精卵の作出と凍結保存; 厚生省神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー症モデル動物の開発に関する研究」野村班, 昭和61年度報告書, pp. 25-29, 1987.

横山峯介・勝木元也・野村達次 : トランスジェニックマウスの研究を支える周辺技術, 実験医学, 6: 54-59, 1988.

横山峯介・長谷川孝徳 : 各種系統マウスにおける自然排卵数と誘起排卵数について 哺乳卵研誌, 6: 151-155, 1989.

横山峯介・秋葉久弥・勝木元也・野村達次 : 凍結マウス精子の体外受精による正常産仔の作成, 実験動物, 39: 125-128, 1990.

横山峯介・日置恭司 : 過排卵処理した各種系統マウスの交尾率と正常胚の回収数について, 哺乳卵研誌, 7: 89-94, 1990.

横山峯介・中冨直巳 : マウス初期胚および精子の凍結保存, 臨床科学, 27: 359-365, 1991.

横山峯介・長谷川孝徳 : 5系統の近交系マウスにおける系統内および系統間の体外受精について, 哺乳卵学誌, 8: 135-139, 1991.

横山峯介 : 実験動物の遺伝的コントロール・凍結保存技術の応用, 実験動物学(田嶋嘉雄監修; 江崎孝三郎・藤原公策・前嶋一淑・光岡知足・高垣善男編),

pp.59-64. 朝倉書店, 東京, 1991.

Yokoyama, M., M. Katsuki and T. Nomura : The creation of mouse models for human diseases associated with reproductive disturbances by *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Exp. Anim.*, in press.

Yokoyama, M., T. Hasegawa, T. Nomura and M. Katuki : Conversion of the genetic background of transgenic mice by *in vitro* fertilization. *Exp. Anim.*, in press.

Yoshiki, A., K. Ohno and N. Wakasugi : Cryopreservation of strains and mutant genes in mice. *Exp. Anim.*, 36: 379-386, 1987.

Zarrow, M. X. and E. D. Wilson : The influence of age on superovulation in the immature rat and mouse. *Endocr.*, 69: 851-855, 1961.

Zeilmaker, G. H. (ed.) : Frozen storage of laboratory animals, Gustav Fischer, Stuttgart, 1981.





